

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Merilin Väärtnõu

RNAPII ja nukleosoomide hulga määramine transkribeeritaval geenil

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Geenitehnoloogia

Juhendajad: MSc Henel Sein
PhD Arnold Kristjuhan
PhD Signe Värvi

Tartu 2016

INFOLEHT

RNAPII ja nukleosoomide hulga määramine transkribeeritaval geenil

Eukariootides toimuvat transkriptsiooni ning RNA polümeraas II (RNAPII) ja nukleosoomide hulga dünaamikat transkriptsioonil on kirjeldatud maailma mastaabis juba palju: on teada, et transkribeeritaval geenil eemaldatakse nukleosoomid ning geeni piirkond täitub RNA polümeraasidega. RNAPII ja nukleosoomide hulga uurimiseks märgitakse valgud erinevate epitoopidega. Selle töö raames uuriti immuunosadestamise meetodil, kuidas mõjutab erinevate epitoopidega märkimine RNAPII ja nukleosoomide hulka ning millist epitoopi valkude märkimiseks eelistada. Selleks märgiti subühik Rpb3 RNAPII hulga iseloomustamiseks ning histoon H3 nukleosoomide hulga iseloomustamiseks epitoopidega. Omavahel võrreldi kromatiini laboris kasutatavaid E2 ja E4 epitoope ning leiti, et nii nukleosoomide kui ka RNAPII hulga määramiseks sobib kõige paremini E2 epitoop. Samuti kasvab RNAPII detekteerimise tugevus epitoopide korduste kasvades. Histoon H3 puhul sellist korrelatsiooni ei täheldatud.

Märksõnad: histoon, RNA polümeraas, epitoop, transkriptsioon, nukleosoom

CERCS kood: B220 Geneetika, tsütogeneetika

The Amount of RNAPII and Nucleosomes on the Transcribing Gene in Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*

There is already much research about the transcription in eukaryotes and the dynamics of RNAPII and nucleosomes: it is well-established that, during transcription, nucleosomes are removed and the gene region is filled with RNAPII molecules. In order to study the amounts of RNAPII and nucleosomes, they are tagged with different epitopes. In this research, the amounts of RNAPII and nucleosomes were studied using the immunoprecipitation method. RNAPII subunit Rpb3 and histone H3 were tagged with the epitopes E2 and E4. The aim of the study was to describe how the amounts of RNAPII and nucleosomes change during transcription and to find out which epitope is preferred to tag proteins. Results showed that E2 epitope is preferred while tagging RNAPII and histone H3 because its detection was better. It was also seen, that when the amount of epitopes was increased, the detection of RNAPII was remarkably better. As for the histone H3, the detection was good regardless of how many epitopes were used.

Keywords: histone, RNA polymerase, epitope, transcription, nucleosome

CERCS code: B220 Genetics, cytogenetics

SISUKORD

INFOLEHT	2
KASUTATUD LÜHENDID	6
SISSEJUHATUS	9
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	10
1.1 Kromatiini struktuur	10
1.2 Eukariootne transkriptsioon	12
1.3 RNA polümeraasi struktuur	13
1.4 RNA polümeraasi hulk transkribeeritaval alal.....	14
1.5 Nukleosoomide dünaamika transkriptsioonis	15
1.6 Valkude märkimine.....	16
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	18
2.1 Töö eesmärgid.....	18
2.2 Materjal ja meetodika	19
2.2.1 Kasutatud söötmed	19
2.2.2 Kasutatud pärmitüved	19
2.2.3 Pärmis transformeerimine.....	21
2.2.4 Genoomse DNA eraldamine	22
2.2.5 <i>Western-blot</i> (WB) aluselise lüüsi meetodil.....	22
2.2.6 Immunosadestamine ja <i>western-blot</i>	23
2.2.7 Kromatiini immuunosadestamine (ChIP).....	25
2.2.8 Kvantitatiivne PCR (qPCR)	27
2.3 Tulemused ja arutelu	29
2.3.1 Mudelsüsteemi kirjeldus	29
2.3.2 E2 ja E4 epitoopidega tüve konstrueerimine ja epitoopide olemasolu kontrollimine...	30
2.3.3 E2 epitoobi korduste arvu olulisus RNAPII detekteerimisel geeni aktiivsel transkribeerimisel	34
2.3.4 E2 ja E4 epitoopide võrdlemine RNAPII detekteerimisel <i>GAL-VPS13</i> geeni aktiivsel transkribeerimisel	36
2.3.5 E2 ja E4 epitoopide võrdlemine histoon H3 detekteerimisel <i>GAL-VPS13</i> geeni transkribeerimisel ja inhibeerimisel	38

KOKKUVÕTE	42
SUMMARY	43
KIRJANDUSE LOETELU.....	44
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	47
LISA 1	48
LISA 2	49
TÄNUSÕNAD	50
LIHTLITSENTS.....	52

KASUTATUD LÜHENDID

ADE – adeniin

bp – *basepair* (aluspaar)

BCIP – *5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate* (5-bromo-4-kloro-3-indolüülfosfaat)

BSA – *bovine serum albumin* (veise seerumalbumiin)

ChIP – *chromatin immunoprecipitation* (kromatiini immuunosadestamine)

CSB – *Cockayne Syndrome B* (transkriptsiooni elongatsioonifaktor)

CTD – *C-terminal domain* (C-terminaalne domeen)

DRB – *5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole* (5,6-dikloro-1-β-D-ribofuranosüül bensimidasool)

DSIF – *DRB Sensitivity Inducing Factor* (transkriptsiooni elongatsioonifaktor)

DTT – *dithiothreitol* (2S, 3S)-1,4-bis(sulfanüül)butaan-2,3-diool

EDTA – *ethylenediaminetetraacetic acid* (etüleen-diamiin tetraatsetaat hape)

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay* (ensüümiga seotud immuno-adsorbentanalüüs)

ELL – *eleven-nineteen lysine-rich leukemia* (RNAPII elongatsioonifaktor)

EtBr – *Ethidium Bromide* (etiidiumbromiid)

FACT – *facilitates chromatin transcription* (kromatiini transkriptsiooni soodustav kompleks)

H2A – histoon 2A

H2B – histoon 2B

H3 – histoon 3

H4 – histoon 4

His – *Histidine* (histidiin)

HRP – *Horseradish Peroxidase* (mädarõika peroksidaas)

kb – *kilobasepair* (kiloaluspaar)

kDa – **kilodalton**

LEU – *leucine* (leutsiin)

LYS – *lysine* (lüsiin)

NBT – *nitro blue tetrazolium chloride* (nitrosinine tetrasool)

N-terminaalne – amino-terminaalne

Paf1 – *polymerase-associated factor 1* (polümeraasiga seondunud faktor)

PBS – *phosphate-buffered saline* (fosfaadiga puhverdatud soolalahus)

P-TEFb – *positive transcription-elongation factor-b* (positiivne transkriptsiooni elongatsioonifaktor)

qPCR – *quantitative PCR, real-time PCR* (kvantitatiivne PCR, reaalaaja PCR)

RNAPII – RNA polümeraas II

RSC – *remodels the structure of chromatin* (kromatiini struktuuri remodelleerija)

SDS – *sodium dodecyl sulfate* (naatriumdodetsüülsulfaat)

Ser2/5 – seriinijääk 2, seriinijääk 5

Spt6 – *Suppressor of Ty 6* (transkriptsiooni elongatsioonifaktor)

SWI/SNF – *switch/sucrose nonfermentable complex*

TBS – *tris-buffered saline* (Tris-iga puhverdatud soolalahus)

TFIIA(B,D,E,F,H) – *transcription factor II A(B,D,E,F,H)* (transkriptsioonifaktor II A(B,D,E,F,H))

TRP – *tryptophan* (trüptofaan)

URA – *uracil* (uratsiil)

Valgu *tag* – valgu märgis

WB – *western blot* (immuunoplekkimine)

WCE – *whole cell extract* (rakkude tuumade ja tsütoplasma ekstrakt)

YPD – *yeast extract*, *peptone*, *dextrose* (pärmis ekstraktsioon, peptoon, dekstroos; kõiki pärmi eluks vajalikke komponente sisaldav pärmisööde)

SISSEJUHATUS

Eukariootides on genoomne DNA pakitud kromatiini, mis koosneb DNA-st ja sellega seotud valkudest. Kromatiini väiksemateks kondenseerunud osadeks loetakse nukleosoomide, mis koosnevad histoonide H2A, H2B, H3 ja H4 oktameerist ja selle ümber keerdunud 147 aluspaari pikkusest DNA-st. Nukleosoomideks pakkimine muudab DNA kompaktsemaks, samas takistab see mitmeid DNA-ga seotud protsesse, eeskätt geenide transkriptsiooni.

Transkriptsiooni aktiveerumisel eemaldatakse nukleosoomid transkribeeritava geeni piirkonnalt ja geeni piirkond täitub transkriptsiooni läbiviivate RNA polümeraasidega. Transkriptsiooni inhibeerimisel jäävad nukleosoomid geeni kodeerivale piirkonnale, seevastu RNA polümeraasi pole seal peaaegu üldse.

Käesoleva töö teoreetilises osas antakse ülevaade nukleosoomide ning RNAPII struktuurist ja dünaamikast, transkriptsioonist ning valkude märkimisest.

Töö praktilises pooles toetutakse meie uurimisgrupis varem tehtud uuringule, kus vaadati RNAPII ja nukleosoomide suhtelist hulka transkribeeritaval geenil siis, kui RNAPII subühiku Rpb3 küljes on kolmekordne E4 epitoop ehk valgumärgis ning histooni H3 küljes E2 epitoop (Värv *et al.* 2007; Peil *et al.* 2011). Sellest lähtuvalt on selle töö eesmärgiks hinnata, millist epitoopi RNAPII ja nukleosoomide märkimiseks eelistada, vahetades selleks ära subühiku Rpb3 ja histooni H3 küljes olevad valgumärgised.

Antud töös kirjeldati ka nukleosoomide suhtelist hulka transkribeeritaval geenil kahel juhul: esiteks, kui transkriptsioon on inhibeeritud ja teiseks, kui transkriptsioon geenilt on aktiveeritud. RNAPII suhtelist hulka vaadeldi ainult transkribeeritaval geenil.

RNAPII ja nukleosoomide hulga uurimiseks pärmi geenil *VPS13* kasutati immuunosadestamise ja qPCR-i meetodit. Selleks märgiti RNAPII subühik Rpb3 ja histoon H3 vastavalt E2 ja E4 epitoopidega, mille tunnevad ära 5E11 ja 1E2 antikehad.

Märksõnad: histoon, RNA polümeraas, epitoop, transkriptsioon, nukleosoom

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Kromatiini struktuur

Eukariootide genoom on pakitud kromatiini, DNA-st ja valkudest koosnevasse kompleksi, mis muudab DNA kompaktsaks ning aitab reguleerida protsesse, nagu transkriptsioon, DNA replikatsioon, rekombinatsioon ja reparatsioon (Bi, 2014).

Kromatiini kompaktsuse aste on genoomis erinev ning selle järgi jaguneb eukariooti kromatiin kaheks: eukromatiiniks ja heterokromatiiniks. Eukromatiin moodustab pagaripärmis genoomist suurema osa. Selles piirkonnas on vähem kondenseerunud alad, mistõttu saab seal toimuda ka transkriptsioon. Seevastu heterokromatiini piirkonnas on alad kondenseerunud ning geene transkribeeritakse vähe (Kouzarides, 2007).

Kromatiin koosneb nukleosoomi kordusühikutest. Nukleosoom on eukariootide tuumas paiknev DNA ja histoonide kompleks, mille abil DNA on pakitud kõrgemat järku struktuuridesse. Nukleosoom koosneb histoonide oktameerist ja selle ümber pakitud 147 aluspaarist DNA-st (joonis 1). DNA on superhelikaalselt ja vasakukäeliselt keerdunud ümber histoonide oktameeri 1,65- korda, mille tõttu DNA lüheneb 6 korda (Olins *et al.* 2003; Adkins *et al.* 2004).

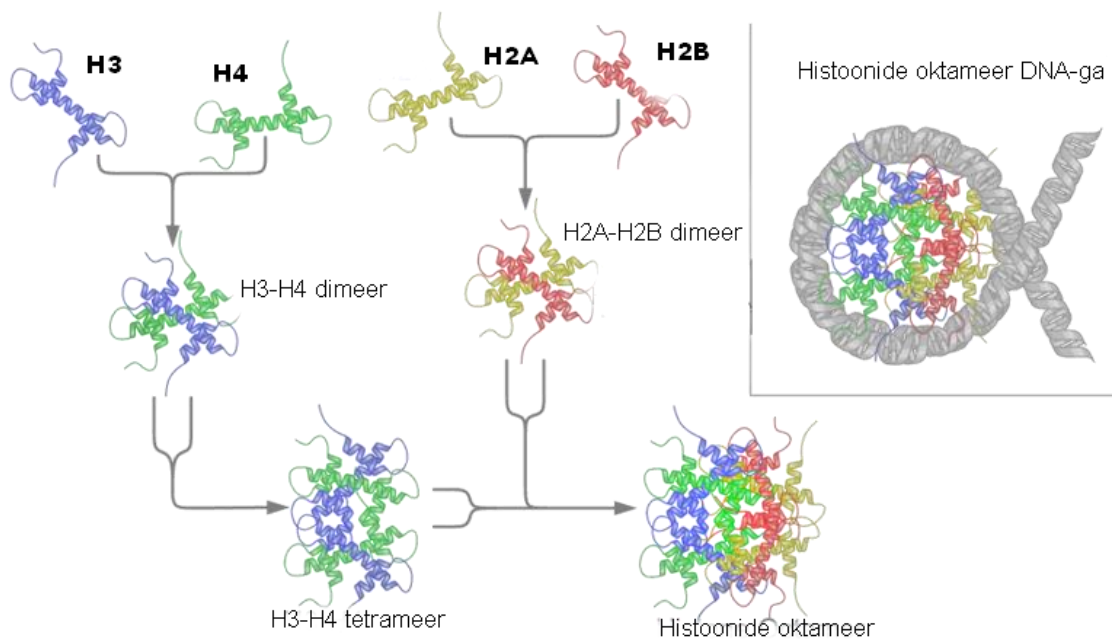
Histoonide oktameeri moodustavad histoonid H2A, H2B, H3 ja H4 kahes korduses. Kaks histoonide H3-H4 dimeeri moodustavad H3 otste kaudu tetrameeri, mida ümbritsevad kummaltki poolt H2A-H2B dimeerid. Skemaatiliselt näeb histoonide paigutus üksteise suhtes välja selline: ([H2A–H2B][{H3–H4}₂] [H2A–H2B]) (Mariño-Ramírez *et al.* 2005).

Nukleosoomi eraldab 10-80 aluspaari pikkune linker-DNA. Sellega on kõrgemates eukariootides seondunud linkerhistoon H1, mis on oluline 30 nm kromatiini fiibri moodustumisel ja stabiliseerimisel (Luger *et al.* 1997, Meluh *et al.* 1998).

Histoonid on väikesed (11-15 kDa) positiivselt laetud tuumavalgud, mis koosnevad C-terminaalsest histooni „kehas“ ja N-terminaalsest histooni „sabast“. Histoonide C-terminaalsetel „kehadel“ on sarnane ehitus. Kolm α -heeliksit on ühendatud L1 ja L2 linguga: $\alpha 1$ -L1- $\alpha 2$ -L2- $\alpha 3$. Histoonide „sabadel“ toimuvad mitmed post-translatsioonilised modifikatsioonid ning nad osalevad kromatiini kõrgema struktuuri tekkel (Cutter *et al.* 2015; Altaf, 2007).

Pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae* kodeerivad igat tuumiku histooni vaid kaks geeni. Geenid *HTA1* ja *HTB1* kodeerivad histooni H2A, geenid *HTA2* ja *HTB2* histooni H2B. Geenid *HHT1* ja *HHF1* kodeerivad histooni H3. Histooni H4 kodeerivad geenid *HHT2* ja *HHF2* (Smith ja Murray, 1983).

Lisaks neljale tuumiku histoonile on olemas ka histooni variandid, mida lisatakse genoomi teatud aegadel kindlatesse kohtadesse. Histooni variandid on leitud histoonil H3 (pagaripärmis Cse4, inimesel CENP-A) ja histoonil H2A (pagaripärmis Htz1, inimesel H2A.Z). Cse4 on vajalik kinetohoori moodustumisel ja on seega oluline pärmi elutegevuseks. H2A variant Htz1 moodustab histoon H2A-st umbes 10%. See on tähtis nii transkriptsiooni initsiatsioonil, sest valmistab geenid ette initsiatsiooniks, värvates transkriptsioonifaktoreid ning lihtsustades nukleosoomide eemaldamist, kui ka elongatsioonil. On näidatud, et Htz1 puudumisel on transkriptsiooni kiirus umbes 24% aeglasem (Eriksson *et al.* 2012, Santisteban *et al.* 2011).



Joonis 1. Nukleosoomi moodustumine. Histoonid H2A ja H2B moodustavad 2 eraldi dimeeri. Histoonid H3 ja H4 moodustavad 2 dimeeri, mis ühinevad tetrameeriks. Dimeeride ja tetrameeri ühinemisel tekib histoonide oktameer. Histoonide oktameer seda ümbritseva DNA-ga moodustab nukleosoomi (Alberts *et al.* 2001).

1.2 Eukariootne transkriptsioon

Transkriptsiooniks nimetatakse RNA sünteesi DNA matriitsi alusel. Eukariootides teostavad valke kodeerivate geenide transkriptsiooni, mis on üheks olulisemaks geeniekspressiooni regulatsiooni etapiks, kolm erinevat DNA-sõltuvat RNA polümeraasi: RNA polümeraas I, II ja III. RNAPI (RNA polümeraas I) sünteesib ribosomaalset RNA-d, RNAPII transkribeerib mRNA-d ja tuuma RNA-sid, ning RNAPIII (RNA polümeraas III) sünteesib transport-RNA-d (ülevaade: Cramer, *et al.* 2008).

Transkriptsioon koosneb kolmest erinevast faasist: initsiatsioonist, elongatsioonist ja terminatsioonist.

Transkriptsiooni initsiatsioon jaguneb kolmeks etapiks: preinitsiatsioon, initsiatsioon ja RNAPII vabanemine promootorilt (ülevaade: Selth, *et al.* 2010).

RNAPII seondub promootoriga, kus ta moodustab preinitsiatsioonikompleksi mediaatori ja basaalse transkriptsioonifaktoritega – TFIID, TFIIA, TFIIB. Preinitsiatsioonikompleksiga seonduvad veel TFIIF, TFIIF ja TFIIE, mis stabiliseerivad RNAPII seost promootoriga. TFIIF-i helikaasse aktiivsuse tõttu voltub DNA topeltheeliks lahti ning RNAPII alustab transkriptsiooni, seondues nii DNA-le kui ka sünteesitavale mRNA-le. RNAPII transkribeerib esimesed 20-50 aluspaari mRNA-d (ülevaade: Shilatifard, 2004).

Initsiatsioonil fosforüleerib transkriptsioonifaktor TFIIF RNAPII suurima subühiku (Rpb1) C-terminaalse domeeni (CTD) seriinijääk 5 (Ser5), mille järel lahkuvad RNAPII-lt peaaegu kõik preinitsiatsiooni kompleksis olevad transkriptsioonifaktorid. P-TEFb (*positive transcription-elongation factor-b*) fosforüleerib CTD seriinijääk 2 (Ser2), mille tulemusena algab elongatsioon (ülevaade: Shilatifard, 2004).

Elongatsiooni edenedes Ser5 fosforüleerituse tase väheneb ning Ser2 fosforüleerituse tase suureneb. RNAPII kiirus *in vivo* on 1500 nukleotiidi minutis. Transkriptsiooni kiiruse reguleerimiseks on RNAPII-l elongatsioonifaktorid: FACT, Spt6, TFIIF, elongiinid, DSIF, CSB ja ELL perekonna valgud. RNAPII-ga seondub otse ka Paf1 kompleks, millele kinnitub hiljem histoonide modifitseeriv süsteem. Elongatsiooniks on vaja erinevate faktorite seondumist otseselt või kaudselt RNAPII CTD-ga (Svejstrup, 2004; Saunders *et al.* 2006; Shilatifard, 1998).

Transkriptsiooni terminatsioonil toimub RNA transkripti vabanemine ja transkriptsioonikompleksi eemaldumine DNA ahelalt. RNAPII CTD defosforüleeritakse, et RNAPII saaks uuesti preinitsiatsioonikompleksiga seonduda (ülevaade: Shilatifard, 2004).

1.3 RNA polümeraasi struktuur

RNAPII kompleks koosneb 12 subühikust ja selle mass on 550 kDa (joonis 2). See on vastutav kogu mRNA sünteesi eest eukarüootides. Polümeraasi saab jaotada neljaks mobiilseks mooduliks mida inglise keeles nimetatakse *core* (tuumik), *jaw-lobe* (lõug), *shelf* (riiul) ja *clamp* (klamber) (Cramer, *et al.* 2001).

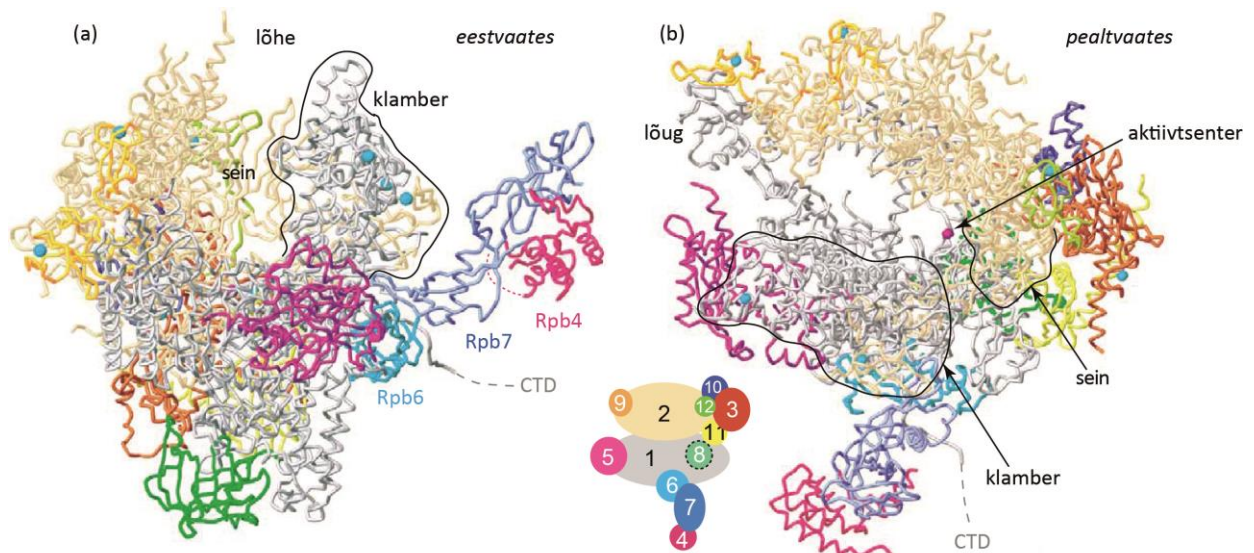
RNAPII koosneb põhiosas 10-subühikulisest 'tuumikust'. Subühikud Rpb1 ja Rpb2 moodustavad positiivselt laetud 'lõhe', millest ühe poole moodustab 'klamber' ning teise poole 'lõug'. DNA siseneb 'lõhe' kaudu polümeraasi ning kinnitub aktiivtsentrile mobiilse elemendi 'lõua' abil (Cramer, *et al.* 2001).

'Lõhes' asuv aktiivtsenter sisaldab metalliiooni Mg^{+2} , mis on pidevalt polümeraasis olemas ja seondub RNA 3'-OH-ga. Aktiivtsentris asub ka mobiilne metalliioon Mn^{+2} , mis seondub NTP trifosfaatidega. Õige NTP valimine on seotud 'klambris' asuva linguga, mis sulgeb aktiivtsentri, kui õige NTP seondub DNA-ga (Cramer, *et al.* 2008).

Transkriptsiooni initsiatsioon saab alata alles siis, kui 'tuumikule' lisanduvad subühikud Rpb4 ja Rpb7 – seega võib neid lugeda transkriptsioonifaktorite hulka. Teised transkriptsiooni kontrollivad faktorid seonduvad CTD-le, mis asub subühikul Rpb1. CTD koosneb hüdrofiilse heptapeptiidi tandemsetest järjestustest YSPTSPS (Bushnell ja Kornberg, 2003; Hahn, 2004).

Transkriptsioonil tekkivaid võimalikke vigu detekteerib ja parandab subühik Rpb9, mis muudab vajadusel polümeraasi konformatsiooni (Knippa ja Peterson, *et al.* 2013).

RNAPII pind on peaaegu täielikult negatiivne, välja arvatud positiivse laenguga 'lõhe', aktiivtsenter ja 'sein'. Erinevad laengud soodustavad DNA kinnitumist RNAPII-le (Cramer, *et al.* 2008).



Joonis 2. RNA polümeraas II struktuur. Joonisel on kujutatud RNAPII eestvaates (a) ja pealtvaates (b). Nii eest- kui ka pealtvaates on näha 'lõhe', mille kaudu siseneb DNA; 'klamber', millele seondub NTP; CTD, millele seonduvad transkriptsioonifaktorid; 'lõug', mille abil DNA kinnitub aktiivtsentrile. Polümeraasi subühikute (Rpb1-Rpb12) värvid on näidatud väiksemal skemaatilisel pildil (Cramer, 2004).

1.4 RNA polümeraasi hulk transkribeeritaval alal

S. cerevisiae rakus on umbes 20 000 RNAPII molekuli ning 10% neist on seotud funktsionaalse transkriptsiooniga. Ülejäänud polümeraasid on inaktiivsed. On leitud korrelatsioon, et inaktiivseks muutuvad sellised polümeraasid, millel puudub subühik Rpb9 (Struhl, 2007; Rodriguez-Gil, *et al.* 2010).

Rohkem kui 2/3 pärmi ekspresseeritavatest geenidest avalduvad madalal tasemel. Geene, mis kodeerivad histoone, ribosomaalseid valke või glükolüütilisi ensüüme, transkribeeritakse kõrgemal tasemel (Peil *et al.* 2011). Ehkki RNAPII komplekside hulk geenilookuses on enam-vähem proportsionaalne geeni transkriptsiooni kiirusega, on polümeraaside hulk kogu rakupopulatsiooni materjalist lähtudes aktiivselt transkribeeritavas lookuses ebaühtlane. Varasemalt on meie uurimisgrupi poolt näidatud, vaadates galaktoosiga aktiveeritavat pagaripärmi mudelgeeni *GAL-VPS13*, et rakupopulatsiooni analüüsides on geeni 5' osas palju rohkem polümeraasi kui 3' osas, nii geeni aktiveerimisel kui ka siis, kui transkriptsiooni elongatsioon on juba mõnda aega kestnud.

Kuna ühe raku tasemel on transkribeeritaval geenilookusel RNAPII-e molekulid jaotunud ühtlaselt, siis võib polümeraasi populatsioonisisese ebaühtlase jaotuse põhjuseks olla see, et mõnedes rakkudes transkriptsiooni küll alustatakse, ent see katkeb. Rakkudes, kus polümeraas viib protsessi lõpuni, on ta aga jaotunud ühtlaselt üle kogu transkribeeritava piirkonna (Peil *et al.* 2011).

1.5 Nukleosoomide dünaamika transkriptsioonis

DNA seotus histoonidega ja selle pakkimine kromatiini muudab valk-DNA kompleksi küll väga stabiilseks, kuid see takistab juurdepääsu DNA-le. Et DNA-le ligi pääseda, on transkriptsiooni juures vajalikud mitmed faktorid, mis suurendavad nukleosoomiga seotud DNA plastilisust.

Esimene grupp kromatiini remodelleerivaid faktoreid on ensüümid, mis modifitseerivad kovalentselt histoonide N-terminaalseid “sabasid” (näiteks metüül- ja atsetüültransferaasid). Need muudavad nukleosoomid mobiilseks ning toetavad teiste faktorite seondumist (Schwabish ja Struhl, 2004).

Teine grupp on ATP- sõltuvad kromatiini remodelleerivad kompleksid, mis muudavad nukleosoomide asetust või struktuuri nii, et DNA oleks kättesaadav. Punguvas pärmis *Saccharomyces cerevisiae* on kolm ATP- sõltuvat kromatiini remodelleerivat kompleksi: Swi/Snf ja RSC kompleks ning Isw valkude perekond.

Nukleosoomide asetuse muutmine võib toimuda kahel viisil, kas *in cis* või *in trans* mehhanismiga. *In cis* mehhanismi puhul tegutseb kromatiini remodelleeriva kompleksina Isw valkude perekond: histoonide oktameerid jäävad DNA-ga seotuks ning vahetavad vaid oma asukohta. *In trans* mehhanismi puhul eemaldatakse histoonide oktameerid DNA-lt täielikult ning selle eest on vastutavad Swi/Snf ja RSC kompleksid. Histoonide aktseptoritena käituvad nukleosoomide eemaldamisel histoonide *chaperonid* ehk abivalgud. Näiteks osaleb abivalk FACT H2A/H2B dimeeri eemaldamises ja hilisemas assambleerimises (reassambleerumisel ühineb FACT-iga ka abivalk Spt6) (Belotserkovskaya *et al.* 2007; Luger ja Hansen, 2005; Rando ja Winston, 2012; Värvi, *et al.* 2007).

Transkriptsiooni aktiveerudes ei eemaldata nukleosoomi vaid promootoritelt, aga ka kodeerivatelt piirkondadelt. Nukleosoomide eemaldamine kodeerivatelt alatelt sõltub transkriptsiooni intensiivsusest.

Kõrgelt transkribeeritavalt aladelt eemaldatakse kõik histoonid, sest selles piirkonnas on rohkem RNAPII molekule. Esimene RNAPII, mis nukleosoomiga kohtub, eemaldab H2A/H2B dimeeri ning nukleosoomist saab heksasoom. Sellele järgnev RNAPII eemaldab ülejäänud tuumiku histoonid. Kui transkriptsioon on keskmise või madala intensiivsusega, siis muutuvad RNAPII molekulide vahed transkribeeritavaal geenil pikemaks ning H2A/H2B dimeerid jõuavad heksasoomiga enne järgmise RNAPII saabumist uuesti seonduda. Sel juhul H3-H4 tetrameere ei eemaldata. (Kristjuhan ja Svejstrup, 2004; Kulaeva, 2010; Li *et al.* 2007).

1.6 Valkude märkimine

Valkude hulga määramiseks kasutatakse erinevaid meetodeid: valgu immuunosadestamine, immuunoelektroforees, *western blot*. Selleks kasutatakse tavaliselt valgu-spetsiifilisi antikehasid. Nende puudumisel või valgu väikese koguse korral, on levinumaks märkimisviisiks valgu *tag*-ide ehk geneetiliste märgiste kasutamine. Valgu *tag* on 6-20 pikkune peptiidi järjestus, mille vastu on olemas antikehad. Märgist kodeeriv DNA järjestus lisatakse valku kodeerivale geenile. Saadud rekombinantset valku kodeeriv järjestus sisestatakse rakku ning valku sünteesides ekspresseeritakse ka selle küljes olev *tag* (Sabourin *et al.* 2007).

Erinevad märgised jagunevad järgmiselt: afiinsed, lahustuvad, kromatograafilised, fluorestseeruvad ja epitoobi märgised. Käesolevas töös keskendutakse valkude märkimisele epitoopidega. Kasutatavamad epitoobid on HA-epitoop, FLAG ja myc epitoobid (Kimple *et al.* 2013).

Käesolevas töös on kasutatud E2 ja E4 epitoope. E2 epitoopidest eristatakse E2a ja E2b epitoope. Need on vastavalt 10 ja 12 aminohappe pikkused peptiidid (E2a: SSTSSDFRDR, E2b: GVSSTSSDFRDR). E2 epitoobid on saadud veise papilloomviiruse tüüp 1 E2 valkudest, mis reguleerivad papilloomviiruse transkriptsiooni ja replikatsiooni. Epitoobi E2b tunneb ära monoklonaalne antikeha 3F12. Monoklonaalne antikeha 5E11 tunneb ära nii epitoobi E2a kui ka E2b.

Varasemalt on näidatud, et võrreldes omavahel epitoope E2a ja E2b, selgub, et 5E11 detekteerib epitoope võrdsel määral, kuid 3F12 tekitab palju nõrgema signaali ning tunneb ära vaid epitooibi E2b (Tamm, 2009). Teise, töös kasutatud E4 epitooibi järjestus on TTGHYSVRD, mis asub veise papilloomviiruse tüüp 1 E2 valgul 182-190 aminohappe piirkonnas. Selle epitooibi tunneb ära 1E2 antikeha.

E2 epitooipidel on teiste epitooipide ees palju eeliseid. Nad ei mõjuta valkude funktsiooni, ei dissotseeru kõrge soola kontsentratsiooni (2 M) juures ning on antikehade suhtes spetsiifilised ja kõrge afiinsusega (Kaldalu *et al.* 2000).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärk on võrrelda epitoopide E2 ja E4 efektiivsust RNAPII ja histoonide märkimisel ning määrata RNAPII ja nukleosoomide hulka transkribeeritaval geenil.

- Teha kindlaks, kumb epitoop on efektiivsem RNA polümeraas II subühik Rpb3 märkimisel.
- Välja selgitada, kas ja kuidas muudab epitoopide korduste suurendamine RNA polümeraas II subühikul Rpb3 selle märkimise efektiivsust.
- Uurida, kumba epitoopi võiks kasutada histoon H3 märkimisel ning kas epitoopide erinevad kordsused mõjutavad histoon H3 märkimise efektiivsust.
- Arutleda, kuidas muutub histoonide ja nukleosoomide suhteline hulk transkribeeritaval geenil.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Kasutatud söötmed

Saccharomyces cerevisiae tüvesid kasvatati YPD (*yeast extract, peptone, dextrose*) tard- [agar 20 g/l, glükoos 20 g/l, mükoloogiline peptoon 20 g/l (LAB MTM), pärmiekstrakt 10 g/l (LAB MTM)] ja vedelsöötmes [mükoloogiline peptoon 20 g/l, pärmiekstrakt 10 g/l, glükoos või galaktoos 200 g/l (Applichem)]. Tardsöötmel kasvatati pärmirakke 30° C juures, vedelkultuure aereeriti loksutil samal temperatuuril.

Pärast kahe pärmitüve ristamist, selekteeriti mõlema pärmitüve modifikatsioone sisaldavaid rakke, kasvatades pärmis –Ura – Leu – Trp (-uratsiil-leutsiin-trüptofaan) agarsöötmel [YNB (Yeast nitrogen base, Applichem) 6.7 g/l, glükoos 2% (Medipharma), agar 2% (LAB MTM), aminohapped ja nukleotiidid – Ade (adeniin) 40 µl/ml, His (histidiin) 40 µl/ml Lys (lüsiin) 80 µl/ml (Serva)].

Plasmiid, kus oli olemas *HIS5* selektsioonimarker, transformeeriti pärmirakkudesse. Rakkude selekteerimiseks kasvatati pärmirakke –Ura – Leu – Trp – His söötmega tassidel [YNB (Yeast nitrogen base, Applichem) 6.7 g/l, glükoos 2% (Medipharma), agar 2% (LAB MTM), aminohapped ja nukleotiidid – adeniin 40 µl/ml, lüsiin 80 µl/ml (Serva)].

2.2.2 Kasutatud pärmitüved

Töös kasutati pärmitüvesid AKY235, 266, 297, 362, 641, 995, 996, mis on konstrueeritud Arnold Kristjuhani töögrupi poolt ning tüvesid AKY997, 1049, 1050, mis konstrueeriti selle töö käigus (Tabel 1). Kõik pärmitüved on W303 taustsüsteemis.

Tüved AKY297, 362, 641, 996, 997, 1049, 1050 omavad mudelgeeni *VPS13* ees olevat reguleeritavat *GAL10* promootrit. Tüvedel AKY235, 266, 641 on RNAPII Rpb3 küljes erinevates kordustes E2 epitoobid. Tüvedel AKY997, 1049, 1050 on lisaks H3 C-terminuses kolmekordne E4 epitoop. Tüvedel AKY995, 996 on H3 C-terminuses kolmekordne E4 epitoop, Rpb3 küljes epitoope ei ole. Tüvel AKY362 on RNAPII Rpb3 küljes kolmekordne E4 epitoop ning H3 C-terminuses ühekordne E2 epitoop.

Pärmitüvede AKY235 ja AKY297 baasil konstrueeriti tüvi AKY997, mis sisaldab ühekordset E2 epitoopi Rpb3 küljes, kolmekordset E4 epitoopi H3 C-terminuses ja *HIS5* markergeeni. Tüve AKY997-lt lõigu amplifitseerimiseks kasutati primereid HHT2f, HHT2kt, FBA1 ning VPS13. Järgmiseks ristati tüved AKY266 ja AKY996 ning saadi tüvi AKY1049, mis sisaldab kahekordset E2 epitoopi Rpb3 küljes ja kolmekordset E4 epitoopi H3 C-terminuses. Seejärel ristati tüved AKY641 ja AKY995 ning saadi tüvi AKY1050, mis sisaldab kolmekordset E2 epitoopi Rpb3 küljes ja kolmekordset E4 epitoopi H3 C-terminuses (Tabel 1).

Tabel 1. Töös kasutatud pärmitüved.

Tüvi	RPB3	H3	Genotüüp
W303	Wt	Wt	<i>S. cerevisiae</i> , MAT A <i>ura3 leu2-3, 112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1 100 lys2</i>
AKY235	1xE2	Wt	W303, MAT α , <i>LYS2, RPB3-1xE2tag::URA3</i>
AKY266	2xE2	Wt	W303, MAT α , <i>LYS2, RPB3-2xE2tag::URA3</i>
AKY297	Wt	Wt	W303, MAT A, GAL-prom- <i>VPS13::TRP1</i> , <i>hht1-hhf1Δ::LEU2</i>
AKY362	3xE4	1xE2	W303, MAT A, GAL-prom- <i>VPS13::TRP1</i> , <i>HHT2-1xE2tag::HIS5</i> , <i>hht1-hhf1Δ::LEU2</i> , <i>RPB3-3xE4tag::URA3</i>
AKY641	3xE2	Wt	W303, MAT A, GAL-prom- <i>VPS13::TRP1</i> , <i>bar1Δ::Hgb</i> , <i>RPB3-3xE2tag::Nat</i>
AKY693	Wt	Wt	W303, MAT A, <i>Cdc45-3xE4tag::bar1Δ</i> , <i>HXK1::URA3</i>
AKY995	Wt	3xE4	W303, MAT α , <i>HHT2-3xE4tag::HIS5</i> , <i>hht1-hhf1Δ::LEU2</i>
AKY996	Wt	3xE4	W303, MAT A, GAL-prom- <i>VPS13::TRP1</i> , <i>HHT2-3xE4tag::HIS5</i> , <i>hht1-hhf1Δ::LEU2</i>
AKY997	1xE2	3xE4	W303, MAT A, GAL-prom- <i>VPS13::TRP1</i> , <i>HHT2-3xE4tag::HIS5</i> , <i>hht1-hhf1Δ::LEU2</i> , <i>RPB3-1xE2tag::URA3</i>

AKY1049	2xE2	3xE4	W303, MAT A, GAL-prom- <i>VPS13::TRP1</i> , <i>HHT2-3xE4tag::HIS5</i> , <i>hht1-hhf1Δ::LEU2</i> , <i>RPB3-2xE2tag::URA3</i>
AKY1050	3xE2	3xE4	W303, MAT A, GAL-prom- <i>VPS13::TRP1</i> , <i>HHT2-3xE4tag::HIS5</i> , <i>hht1-hhf1Δ::LEU2</i> , <i>RPB3-3xE2tag::natMX6</i> , <i>hphMX6::bar1Δ</i>

2.2.3 Pärimi transformeerimine

Pärmitüve, mis oli saadud tüvede AKY235 ja AKY297 ristamisel, kasvatati üleöö 25 ml vedelsöötmes 30°C juures loksutil (200 rpm) tiheduseni $2,5 \times 10^7$ rakku/ml. Kasvanud rakud tsentrifuugiti 5 minutit 1200 rpm (*Sigma* 4K 15C, rootor 272/F), eemaldati sööde ja suspendeeriti rakud 9 ml steriilses TE-s (10 mM TrisHCl pH 7.5; 1 mM EDTA) ning lisati 1 ml 1 M LiAc (lõppkontsentratsioon 0.1 M). Rakud pandi uuesti loksuma 45 minutiks 30°C juurde (100 rpm). Pärast seda lisati rakkudele 250 µl 1 M DTT ((2S, 3S)-1,4-bis(sulfanüül)butaan-2,3-diool) ja jäeti samadel tingimustel 15 minutiks loksuma. Seejärel lisati rakkudele 40 ml vett ja fuugiti 5 minutit 1000 rpm juures (*Sigma* 4K 15C, rootor 272/F). Rakke pesti 2 korda 50 ml külma veega (tsentrifuugiti 4°C juures). Pestud rakud suspendeeriti 1 ml jääkülmas 1 M sorbitoolis ja kanti üle 1.5 ml *Eppendorf* tuubidesse, fuugiti 1 minut 6000 rpm (*Eppendorf Centrifuge* 5415D, rootor F45-24-11), suspendeeriti 1 ml 1 M sorbitoolis ja fuugiti veelkord. Seejärel suspendeeriti rakud 100 µl 1 M sorbitoolis. Rakud jagati nelja *Eppendorffi* tuubi, igasse tuubi pandi 50 µl rakke. Rakkudele lisati vastavalt 2 µl, 5 µl, 10 µl poreeritavat DNA-d (varasemalt 3xE4-*HIS5* plasmiidilt amplifitseeritud lõik) ning kontrolliks lisati rakkudele 10 µl vett. Elektroporeerimine viidi läbi 2 mm küvettides (GenePulser X Cell™ BioRad). Pärast poreerimist lisati rakkudele kohe 1 ml sorbitooli ning rakud asetati 10 minutiks jääle. Rakud tõsteti küvettidest *Eppendorf* tuubidesse, tsentrifuugiti 4°C juures 1 minut 6000 rpm (*Eppendorf Centrifuge* 5415D, rootor F45-24-11), resuspendeeriti 40 µl 1 M sorbitoolis ning külvati –*URA-LEU-HIS-TRP* tassile.

2.2.4 Genoomse DNA eraldamine

Pärmirakkudest genoomse DNA saamiseks võeti –*URA-LEU-HIS-TRP* tassilt üks pärmikoloonia, mis suspendeeriti *Eppendorffi* tuubis 100 µl-s 200 mM LiOAc-s, kuhu oli lisatud SDS lahust (lõppkontsentratsiooniga 1%). Rakke inkubeeriti 5 minutit 70°C juures. Seejärel lisati 600 µl 96% etanooli ja fuugiti 3 minutit 14000 rpm (*Eppendorf Centrifuge* 5415D, rootor F45-24-11). Sadet pesti 70% etanooliga ning seejärel lahustati DNA sade 100 µl vees.

Proove fuugiti 15 sekundit 14000 rpm (*Eppendorf Centrifuge* 5415D, rootor F45-24-11) ning 1 µl supernatanti kasutati PCR-iks (Lööke, *et al.* 2011).

2.2.5 Western-blot (WB) aluselise lüüsi meetodil

Pärmitüvesid AKY212, 693, 997 kasvatati üleöö 10 ml-s 2% glükoosi sisaldavas YPD vedelsöötmes 30°C juures loksutil (200 rpm) tiheduseni 1.5×10^7 rakku/ml. 1.5 ml rakuöödet koos rakkudega koguti 1.5 ml *Eppendorf* tuubi, fuugiti 12 sekundit maksimaalsel kiirusel (13200 rpm; *Eppendorf Centrifuge* 5415D, rootor F45-24-11), supernatant valati ära ja lisati 1 ml vett. Seejärel fuugiti rakke uuesti 12 sekundit maksimaalsel kiirusel (13200 rpm; *Eppendorf Centrifuge* 5415D, rootor F45-24-11) ja rakud võeti üles 100 µl-s vees. Lisati 100 µl 0.2 M NaOH-d ja hoiti rakke 5 minutit toatemperatuuril. Rakud fuugiti uuesti 30 sekundit maksimaalsel kiirusel (13200 rpm; *Eppendorf Centrifuge* 5415D, rootor F45-24-11), supernatant aspireeriti ning rakkudele lisati 100 µl 2x SDS laadimispuhvit (0.06 M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% 2-merkaptotetanool, 10% glütserool, 0.002% broomfenoolsinine). Rakke kuumutati 100°C juures 5 minutit, fuugiti 5 minutit maksimaalsel kiirusel (13200 rpm; *Eppendorf Centrifuge* 5415D, rootor F45-24-11). Supernatant tõsteti uude 1.5 ml *Eppendorf* tuubi ning sellest kanti 20 µl geelile.

Valgud lahutati 15% SDS-poliakrüülamiidgeelis [1/3 geelist kontsentreeriv: 5% akrüülamiid; 1 M Tris-HCl pH 6.8; 10% SDS; 10% NAPS (naatrium persulfaat), TEMED (N,N,N',N' – tetrametüületüleendiamiin); 2/3 geelist lahutav: 15% akrüülamiid, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8; 10% SDS, 10% NAPS; TEMED]. Geeli voolutati ühekordses SDS puhvris (0.125 M Tris, 0.96 M glütsiin, 0.5% SDS) 50 V juures ~1h (kuni valgud läbisid kontsentreeriva geeli). Alates lahutavast geelist voolutati geeli 100 V juures.

Peale voolutamist inkubeeriti geeli ja eelnevalt metanoolis märjatud PVDF membraani (*Millipore ImmobilonTM*) ülekandepuhvris (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0.037% SDS, 20% metanool) 30 minutit. 3 Whatmani paberilõiku immutati ülekandepuhvris ja asetati pool-kuiva ülekande masinale (*BIO-RAD Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell*), nende peale asetati PVDF membraan (*Millipore ImmobilonTM*), membraani peale akrüülamiidgeel ja 4 Whatmani paberilõiku. Valkude ülekanne toimus 40 minutit 15 V juures (*BIO-RAD Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell*). Peale valkude ülekandumist blokeeriti membraani üleöö 5% lõssipulbrilahust sisaldavas 1x PBS-0.01% Tween20 (koostis LISA 1) lahuses 4°C juures.

Antikehade seostumine toimus 5% lõssipulbrilahust sisaldavas 1x PBS-0.01% Tween20 lahuses. Primaarse antikehaga inkubeeriti membraani 1 h toatemperatuuril ja pesti 3 korda 10 minutit PBS-0.01% Tween20-ga. Primaarse antikehana kasutati Mouse Anti-1E2 antikeha (lahjendusega 1:8000, algkontsentratsioon 1 mg/ml), mis tunneb ära histooniga H3 seondunud E4 epitoobid ning Mouse Anti-3F12 5E11 antikeha (lahjendusega 1:8000, algkontsentratsioon 1 mg/ml), mis tunneb ära polümeraasiga seondunud E2 epitoobid. Seejärel lisati sekundaarne antikeha Goat Anti-Mouse, mille küljes oli aluseline fosfataas. Sekundaarse antikehaga inkubeeriti 45 minutit ja pesti 3 korda 10 minutit PBS-0.01% Tween20-ga. Seejärel pesti membraan 1 kord 10 minutit AP (aluseline fosfataas) puhvriga (100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 100mM Tris pH 9.5). Sellele lisati 330µg/ml NBT-d (nitrosinine tetrasool, Sigma-Aldrich) ja 167µg/ml BCIP-i (5-bromo-4-klooro-3-indolüülfosfaat, Sigma-Aldrich) ning loksutati, kuni signaali tekkimiseni.

2.2.6 Immunosadestamine ja *western-blot*

Pärmitüvesid AKY362, 997, 1049, 1050 kasvatati üleöö 25 ml-is 2% glükoosi sisaldavas vedelsöötmes ja 25 ml-is 2% galaktoosi sisaldavas YPD vedelsöötmes 30°C juures loksutil (200 rpm) tiheduseni $1,5 \times 10^7$ rakku/ml. 10 ml rakusöödet koos rakkudega koguti 50 ml falkonisse, fuugiti 5 minutit 1500 rpm (*Sigma 4K 15C*, rootor 272/F) ja eemaldati sööde. Rakud suspendeeriti 1 ml jääkülmas vees ja kanti üle *Eppendorf* tuubidesse. Rakusade suspendeeriti jääkülmas 1 ml 2 M LiOAc-is ja inkubeeriti 5 minutit jääl. Seejärel fuugiti 6600 rpm 30 sekundit (*Eppendorf Centrifuge 5415D*, rootor F45-24-11) ning supernatant aspireeriti. Sade suspendeeriti 1 ml jääkülmas 0.4 M NaOH-s ja inkubeeriti jääl 5 minutit, fuugiti 6600 rpm 30 sekundit (*Eppendorf Centrifuge 5415D*, rootor F45-24-11), supernatant aspireeriti.

Proovidele lisati 100 µl SDS laadimispuhvrit (0.06 M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% 2-merkaptotetanool, 10% glütserool, 0.002% broomfenoolsinine). Lüsaati sonikeeriti (*Diagenode – BioruptorTM*) 4 minutit (4 x 30 sekundit sonikeerimist, 1 minut pausi, 100 W, 0°C juures). Rakud jaotati alikvootidesse (2x 50 µl), tööd jätkati ühe alikvoodiga. Valke denatureeriti 95°C juures 5 minutit, tehti umbes 10 sekundit kestev tugev vortex (*Vortex Genie2 – Scientific Industries*), tsentrifuugiti 5 minutit maksimaalsel kiirusel (13200 rpm; *Eppendorf Centrifuge 5415D*, rootor F45-24-11) ja lüsaat viidi üle uude *Eppendorf* tuubi.

Valgud lahutati 15% SDS-poliakrüülamiidgeelis [1/3 geelist kontsentreeriv: 5% akrüülamiid; 1 M Tris-HCl pH 6.8; 10% SDS; 10% NAPS (naatrium persulfaat), TEMED (N,N,N',N' – tetrametüületüleendiamiin); 2/3 geelist lahutav: 15% akrüülamiid, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8; 10% SDS, 10% NAPS; TEMED]. Geeli voolutati ühekordses SDS puhvris (0.125 M Tris, 0.96 M glütsiin, 0.5% SDS) 50 V juures ~1h (kuni valgud läbisid kontsentreeriva geeli). Alates lahutavast geelist voolutati geeli 100 V juures.

Peale voolutamist inkubeeriti geeli ja eelnevalt metanoolis märjatud PVDF membraani (*Millipore ImmobilonTM*) ülekandepuhvris (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0.037% SDS, 20% metanool) 30 minutit. 3 Whatmani paberilõiku immutati ülekandepuhvris ja asetati pool-kuiva ülekande masinale (*BIO-RAD Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell*), nende peale asetati PVDF membraan (*Millipore ImmobilonTM*), membraani peale akrüülamiidgeel ja 4 Whatmani paberilõiku. Valkude ülekanne toimus 40 minutit 15 V juures (*BIO-RAD Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell*). Peale valkude ülekandumist blokeeriti membraani üleöö 5% lõssipulbrilahust sisaldavas 1x TBS (koostis LISA 1) lahuses 4°C juures.

Antikehade seostumine toimus 5% lõssipulbrilahust sisaldavas 1x TBS-is. Primaarse antikehaga inkubeeriti membraani 1 h toatemperatuuril ja pesti 2 korda 5 minutit TBS-0.01% Tween20-ga (koostis LISA 1). Primaarse antikehana kasutati 5E11 antikeha (lahjendusega 1:5000, algkontsentratsioon 1 mg/ml), mis tunneb ära E2 epitoobid ning 1E2 antikeha (lahjendusega 1:5000, algkontsentratsioon 1 mg/ml), mis tunneb ära E4 epitoobid. Seejärel blokeeriti membraan uuesti 5% lõssipulbrilahust sisaldava 1x TBS-iga 5 minutit.

Membraani inkubeeriti sekundaarse antikehaga 3% lõssipulbrilahust sisaldavas 1x TBS-is 1 tund toatemperatuuril ja pesti 3 korda 5 minutit ja 2 korda 8 minutit 0.05% TBS-Tween20-ga, Sekundaarse antikehana kasutati HRP-ga (*Horseradish Peroxidase*) konjugeeritud hiire antikehade vastast antikeha (lahjendusega 1:1000, algkontsentratsioon 1 mg/ml).

Peale pesemist töödeldi membraani *MILLIPORE Immobilon Western* reagentidega (*HRP Substrate Luminol* ja *HRP Substrate Peroxide*), mõlemaid võeti 750 µl, segati kokku ja pandi membraanile. Membraani inkubeeriti reagentidega 5 minutit toatemperatuuril ja signaal detekteeriti masinaga *Biospectrum® Imaging SystemTM* (*Ultra-Violet Products Ltd.*).

2.2.7 Kromatiini immuunosadestamine (ChIP)

A. Pärmirakuekstrakti valmistamine

Pärmitüvesid AKY362, 997, 1049, 1050 kasvatati üleöö 25 ml-is 2% glükoosi sisaldavas YPD vedelsöötmes ja 25 ml-is 2% galaktoosi sisaldavas vedelsöötmes 30°C juures loksutil (200 rpm) tiheduseni 3.3×10^6 - 4.3×10^7 rakku/ml. Seejärel fikseeriti rakud 37% formaldehüüdiga (lõppkontsentratsiooniga 1%), lasti toatemperatuuril 15 minutit seista, aeg-ajalt segades. Lisati 2.5 ml 2 M glütsiini (lõppkontsentratsioon 200 mM), lasti seista 5 minutit toatemperatuuril. Seejärel pesti rakud kaks korda 10 ml 1xPBS-ga (koostis LISA 1), tsentrifuugiti 5 minutit 1500 rpm (*Sigma 4K 15C*, rootor 272/F). Rakud resuspendeeriti 1 ml FA-lüüsipuhvris (koostis LISA 1) ning viidi *Eppendorf* tuubidesse, tsentrifuugiti 12 sekundit (maksimaalse kiiruse saavutamiseni), eemaldati supernatant ning rakud suspendeeriti 500 µl FA-lüüsipuhvris. Rakususpensioonile lisati klaaskerakesi [0.5 mm *Glass Beads (Soda Lime) (BioSpec Products Inc.)*] kuni 800 µl-ni. Rakke lõhuti 15 minutit klaaskerakestega 4°C juures, kasutades masinat *Disruptor GeneTM* (*Scientific Industries*). Rakulüsaadi kättesaamiseks tehti naaskliga *Eppendorfi* tuubi põhja auk ning asetati 1.5 ml *Eppendorf* tuub 15 ml tuubi sisse. Tsentrifuugiti 3 minutit 1500 rpm (*Eppendorf Centrifuge 5415D*, rootor F45-24-11) ning saadud lüsaadile lisati 900 µl FA-lüüsipuhvrit. Lüsaati sonikeeriti (*Diagenode – BioruptorTM*) 8 minutit (6 x 30 sekundit sonikeerimist, 1 minut pausi, 200 W, 0°C juures). Rakulüsaat viidi 1.5 ml *Eppendorf* tuubi, tsentrifuugiti 5 minutit 4°C juures maksimaalsel kiirusel (13200 rpm; *Eppendorf Centrifuge 5415D*, rootor F45-24-11). Supernatant viidi uude tuubi ning korrati tsentrifuugimist 15 minutit 4°C juures (13200 rpm; *Eppendorf Centrifuge 5415D*, rootor F45-24-11). Saadud supernatant on nii rakkude tuumade kui tsütoplasma ekstrakt WCE (*whole cell extract*).

B. Immuunosadestamine (IP)

Immuunosadestamisel kasutati kommersiaalsed antikeha 5E11 (lisati IP kohta 0.4 µl, algkontsentratsioon 1 mg/ml), mis tunneb ära E2 epitoobi ning antikeha 1E2 (lisati IP kohta 0.4 µl, algkontsentratsioon 1 mg/ml), mis tunneb E4 epitoobi. Töös kasutatud tüved AKY997, 1049, 1050 sisaldavad RNAPII Rpb3 C-terminuses vastavalt ühe-, kahe- ja kolmekordset E2 epitoopi, mille tunneb ära 5E11 antikeha ning histooni H3 C-terminuses kolmekordset E4 epitoopi, mille tunneb ära 1E2 antikeha. AKY362 on tüvi, millel on RNAPII Rpb3 küljes kolmekordne E4 epitoop ning histoon H3 C-terminuses on ühekordne E2 epitoop. 150 µl WCE inkubeeriti antikehaga ja 150 µl FA-lüüsipuhvriga üleöö 4° C juures.

IP proove tsentrifuugiti 15 minutit 4° C juures täiskiirusel (13200 rpm; *Eppendorf Centrifuge 5415R*, rootor F45-24-11) ning supernatant viidi uude 1.5 ml *Eppendorf* tuubi. Proteiin-A kerakesi [*ProteinA SepharoseTM Fast Flow (GE Healthcare Bio-Sciences AB)*] inkubeeriti 15 minutit BSA-ga [BSA (*Bovine serum albumin*, *BioTop*, lõppkontsentratsioon 1 mg/ml) + FA-lüüsipuhver] 4° C juures, pidevalt aeglaselt segades. 15 µl proteiin-A kerakesi ja 30 µl puhvrit (BSA+FA-lüüsipuhver) lisati IP proovidele ning inkubeeriti 1.5 h 4° C juures. IP reaktsioone tsentrifuugiti 1 minut 6000 rpm juures (*Eppendorf Centrifuge 5415D*, rootor F45-24-11). Proove pesti järjestikku 1 ml FA-lüüsipuhvriga (koostis LISA 1), FA500 (koostis LISA 1) ning TES pesulahusega (koostis LISA 1) (iga lahusega 5 minutit, 4° C juures, aeglaselt segades). Seondunud valk-DNA kompleksid elueeriti 100 µl elueerimispuhvriga (koostis LISA 1) toatemperatuuril 10 minutit, segati aegajalt vortexil. Elueerimise etappi korrati. Proove tsentrifuugiti 1 minut 6000 rpm juures (*Eppendorf Centrifuge 5415D*, rootor F45-24-11) ning koguti supernatant. Lisati 200 µl H₂O ning 1 µl Proteinaas K-d (algkontsentratsiooniga 18.7 mg/ml, *Fermentas*) ja inkubeeriti 65° C juures 5 h. DNA eraldati fenool-kloroformi töötlusel. Proovile lisati 400 µl fenool-kloroformi (1:1), segati vortexil ning tsentrifuugiti 5 minutit maksimaalsetel pööretel (13200 rpm; *Eppendorf Centrifuge 5415D*, rootor F45-24-11). Saadud vesifaasile lisati 400 µl veega küllastatud kloroformi. Segati vortexil ja tsentrifuugiti 5 minutit 13200 rpm juures (*Eppendorf Centrifuge 5415D*, rootor F45-24-11). Vesifaas viidi 2 ml *Eppendorf* tuubi ja lisati 50 µl NaOAc (algkontsentratsioon 3 M), 1 µl glükokeeni (algkontsentratsioon 20 mg/ml) ja 1.5 ml külma 96% EtOH. Proovid pandi sadenema -80° C juurde (minimaalselt 20 minutit). Proove tsentrifuugiti 4° C juures 15 minutit (13200 rpm; *Eppendorf Centrifuge 5415D*, rootor F45-24-11).

DNA pesti 400 µl 70% külma EtOH-ga ning tsentrifuugiti uuesti 4° C juures 5 minutit (13200 rpm; *Eppendorf Centrifuge 5415D*, rootor F45-24-11). DNA lahustati 40 µl-s H₂O-s. qPCR-il (*quantitative PCR*) kasutati 5 µl DNA-d.

2.2.8 Kvantitatiivne PCR (qPCR)

Kromatiini immuunosadestamisel eraldatud DNA-d analüüsiti qPCR-il (7900 *HT Fast Real-Time PCR system*, *Applied Biosystems*), kasutades DNA-ga seonduvat fluorestseeruvat SYBR Green® värvi. qPCR analüüs viidi läbi 10.25 µl segus [DNA 5 µl; qPCR-i segu (2x, *Maxima SYBR Green ROX®*, *qPCR Master Mix*, *Solis BioDyne*) 5 µl; praimerid 0.25 µl (10 pmol/µl)]. Iga praimerite paariga analüüsiti proovi kolmes erinevas kannus.

qPCR-iks kasutati 7900 *HT Fast Real-Time PCR system*, *Applied Biosystems* masinat. PCR tsükkel oli järgmine:

1. etapp – 95°C 15 minutit (ensüümi aktivatsioon)
2. etapp – 95°C 15 sekundit (denaturatsioon), 60°C 1 minut (praimerite seondumine ja elongatsioon)

Teist etappi korraldati 40 korda.

3. etapp (dissotsiatsioon) – 95° C 15 sekundit, 60° C 15 sekundit, 95° C 15 sekundit.

qPCR-i tulemuste analüüsimiseks kasutati arvutiprogrammi *Microsoft Excel*. Immuunosadestamisel eraldatud DNA analüüsimiseks qPCR-il kasutati 23-26 nukleotiidi pikkuseid praimereid (*Metabion*, *Proligo*). Praimerid on sünteesitud *VPS13* geeni erinevate piirkondade amplifitseerimiseks. Tulemuste normaliseerimiseks kasutati pärmi kromosoomis IX asuvat geeni *FBA1*. Töös kasutatud praimerid on toodud tabelis 2.

Tabel 2. qPCR-il kasutatud praimerid.

Seondumispiirkond <i>VPS13</i> geenil	Järjestus (5' - 3')
Promootorala	F GCTAAACCGATTGCTAGGCTCATA R ATCCCTGATTTCACATCTATGGGTA
2.6 kb	F ACGTTAATTACTCTTCTGGTTCCGA R AGAATGCTATTTTCGCCTGATCGAT
4.5 kb	F TGGCAATGGACTATTTGGTTTCT R ATCACCACTTCTTGAAGCTT
8.5 kb	F TGAGAGACACTATACGACCCAGT R TTCTTGAGGCCTATCATTTCATCATGT
Normaliseerimiseks kasutatud praimerid	
<i>FBA1</i>	F TTGCACCCAATCTCTCCAAACTT R ATTCTGGTCTCAAAGCGATGTCA

2.3 Tulemused ja arutelu

Käesolevas töös arutleti, kuidas muutub nukleosoomide suhteline hulk *GAL10* promootoriga reguleeritaval pärmi geenil *VPS13* kahel juhul: transkriptsiooni inhibeerimisel ja selle aktiveerimisel. RNAPII suhtelise hulga muutumist vaadeldi ainult transkribeeritaval geenil.

Nukleosoomide ja RNAPII hulga määramiseks märgitakse histoon H3 ja Rpb3 epitoopidega. Nende valkude märkimiseks kasutatakse meie töögrupis eelistatult E2 ja E4 epitoope. Seega uuriti, kas mõlemad epitoobid märgivad antud valke võrdse tugevusega ning kuidas sõltub signaali tugevus epitoopide kordsusest.

2.3.1 Mudelsüsteemi kirjeldus

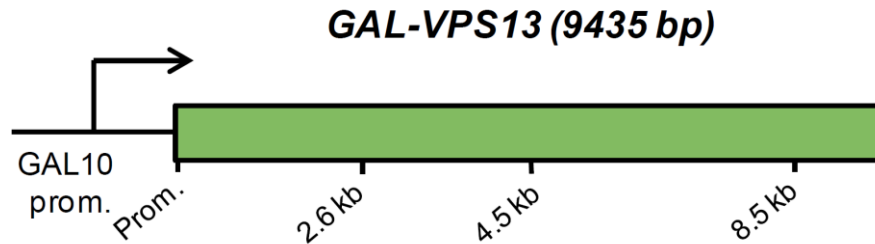
Katsed viidi läbi mudelorganismis *Saccharomyces cerevisiae*. Pärm on eukarüootne organism, mis kasvab kiiresti ja millel on hästi uuritud geneetiline taust. Seetõttu on pärmi hea kasutada bioloogiliste uurimiste teostamiseks.

Pagaripärmi genoom sisaldab ligi 6000 geeni ning keskmine geeni pikkus on 1.5 kb, mistõttu on erinevatel geenidel toimuvaid transkriptsiooni etappe (initsiatsioon, elongatsioon, terminatsioon) raske eristada. Seepärast on kasutatud mudelgeenina üht pikimat pärmi geeni *VPS13*, mille pikkus on 9.4 kb (Joonis 3). Geen *VPS13* asub pagaripärmi XII kromosoomis ning on vajalik pärmide sporulatsiooni juures: geen *VPS13* aktiveerib membraanis fosfolipaas D Spo14 prospoori, edendades selle kaudu membraani kasvu; osaleb tsütokineesis ning reguleerib membraani paindumist. Samas ei ole selle deleteerimine rakkudele letaalne ega mõjuta rakkude fenotüüpi (Park ja Neiman, 2012).

Geeni *VPS13* ette on viidud tugev *GAL10* promootor, mis galaktoosi lisamisel söötmele initsieerib *VPS13* geeni transkriptsiooni. Glükoosi lisamisel söötmele transkriptsiooni ei toimu.

Et näha RNAPII ja H3 suhte muutust kogu geeni ulatuses, kasutati *GAL-VPS13* spetsiifilisi praimereid, mis tunnevad ära geeni erinevaid piirkondi: promootorala, 2.6 kb, 4.5 kb, 8.5 kb. *GAL-VPS13* induktsioon viib nukleosoomide eemaldamiseni nii promootorist kui ka tervest *VPS13* geeni kodeerivast piirkonnast.

Galaktoosiga induksioonil võib näha RNAPII promootoril ja kogu kodeeriva geeni piirkonnas. Histoone kadu *GAL-VPS13* lookusest ei mõjuta naaberlookuste nukleosoomide struktuuri (Värv *et al.* 2007).

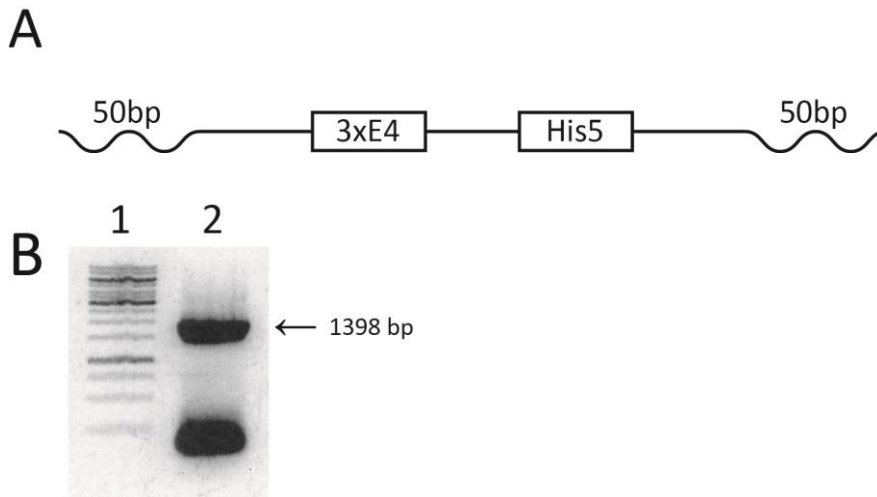


Joonis 3. Geeni *GAL-VPS13* skemaatiline joonis. Joonisel on näidatud mudelgeen *VPS13*, mille ees on galaktoosiga indutseeritav promootor *GAL10*. Geeni all on kujutatud qPCR-il kasutatud *GAL-VPS13* spetsiifiliste praimerite seondumiskohad.

2.3.2 E2 ja E4 epitoopidega tüve konstrueerimine ja epitoopide olemasolu kontrollimine

Et mõõta kvantitatiivselt RNA polümeraasi ja nukleosoomide hulka mudelgeenil, konstrueeriti tüvi AKY997, milles RNA polümeraasi subühiku Rpb3 C-terminus on märgitud ühekordse E2 epitoobiga ning nukleosoomi histoon H3 C-terminus kolmekordse E4 epitoobiga. Epitoopidega märkimine on vajalik immuunosadestamiseks. RNAPII hulga määramiseks märgiti subühik Rpb3 seetõttu, et see on alati polümeraasis olemas ning tähistab kogu polümeraasi hulka. Nukleosoomide hulga vaatamiseks märgiti histoon H3, sest see asub nukleosoomi keskel ja on nukleosoomis pidevalt olemas.

Epitoop-märgistatud H3 ja RNAPII-ga pärmitüve loomiseks amplifitseeriti plasmiidilt (LISA 2) 1398 bp pikkune kolmekordne E4-*HIS5* DNA fragment, mis sisaldab plasmiidilt kopeerituna *HIS5* markergeeni, kolmekordset E4 epitoopi ning lisaks *HHT2* lookustega homoloogseid 50 bp pikkuseid DNA järjestusi (skeem: joonis 4A; geelipilt: joonis 4B). Amplifitseerimiseks kasutati primereid HHT2f ja HHT2kt.

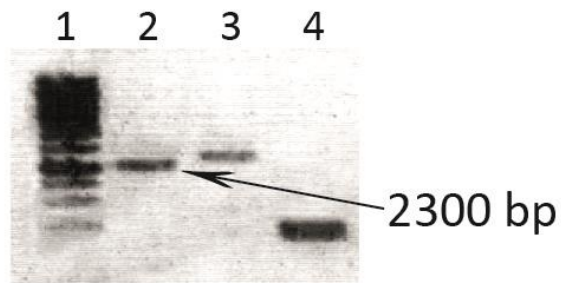


Joonis 4. Kolmekordset E4 epitoopi ja His5 markergeeni sisaldava DNA lõigu amplifitseerimine HIS5-plasmiidilt. (A) skeem 1398 bp pikkusest 3xE4-HIS5 DNA fragmendist, mis sisaldab HIS5 markergeeni, kolmekordset E4 epitoopi ning *HHT2* lookustega homologseid 50 bp pikkuseid DNA järjestusi. (B) Geelipilt, visualiseerimaks plasmiidilt amplifitseeritud DNA fragmenti, mille pikkus on 1398 bp. Esimesel rajal on marker. Teisel rajal on plasmiidilt amplifitseeritud lõik. Agarosgeel on värvitud EtBr-ga.

Pärmitüved AKY235 ja AKY297 ristati, et saada tüvi (genotüüp: *GAL-prom-VPS13::TRP1*, *hht1-hhf1* Δ ::*LEU2*, *RPB3-1xE2tag* ::*URA3*), kus on Rpb3 küljes ühekordne E2 epitoop juba olemas. Saadud tüvesse transformeeriti amplifitseeritud PCR-i produkt (1398 bp), lõpptulemusena saadi tüvi AKY997.

Transformatsiooni käigus peaks saadud PCR-i produkt integreeruma homologilise rekombinatsiooni teel genoomis *HHT2* lookusesse, tekitades transleeritava H3 valgu C-terminusse kolmekordse E4 epitoobi. Transformeeritud rakud külvati *-URA-LEU-TRP-HIS* tassile. Moodustunud kolooniad olid võimelised sünteesima uratsiili, leutsiini, trüptofaani ja histidiini, mis tähendas, et vastavad markergeenid olid nende genoomi integreerunud. Seejärel eraldati saadud kolooniatest genoomne DNA ning viidi läbi PCR praimeritega HHT2f ja HHT2kt, et täpsemalt kontrollida, kas kolmekordne E4 epitoop on integreerunud ristatud pärmitüve genoomi. Õnnestunud integratsiooni korral on PCR-i produkti pikkus 2300 bp (mõned aluspaarid enne *HHT2*, plasmiidi osa koos kolmekordse E4 epitoobiga (1789 bp), mõned aluspaarid *HHT2* tagant), mida on näha joonisel 5, rajal 2.

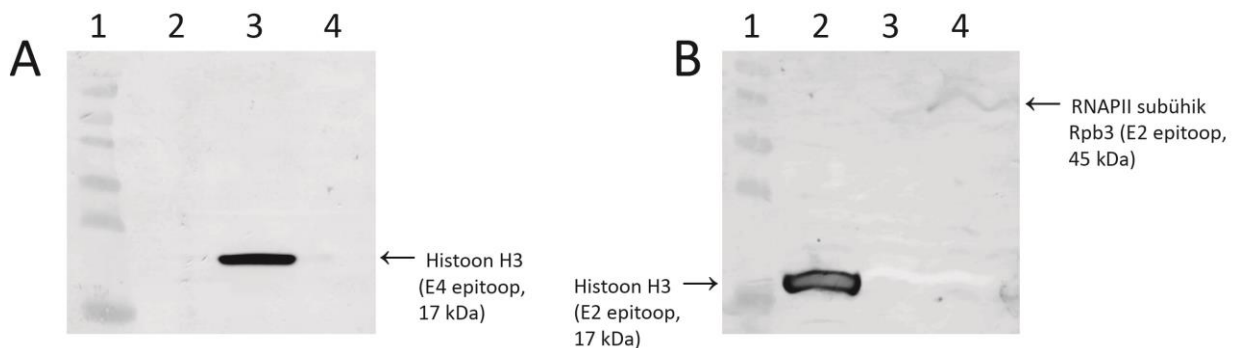
Positiivse kontrollina kasutati tüve AKY997 praimeritega HHT2f ja FBA1, mida on näha kolmandal rajal ning negatiivse kontrollina uuritavat tüve praimeritega VPS13f ja VPS13r, mida on näha rajal 4.



Joonis 5. Kolmekordse E4 epitoobi kontroll PCR-il. Esimesel rajal on marker, teisel rajal uuritav tüvi (AKY997, praimerid HHT2f+HHT2kt), oodatav suurus on 2300 bp. Kolmandal rajal on positiivne kontroll (AKY997, praimerid HHT2f+FBA1), oodatav suurus on 2300 bp. Neljandal rajal negatiivne kontroll (AKY 997, praimerid VPS13f ja VPS13r), oodatav suurus 500 bp.

Leiti, et amplifitseeritud lõik *3xE4tag-HIS5* plasmiidilt on integreerunud ristatud pärmitüvesse.

Valkude Rpb3 ja H3 ekspressiooni tüves AKY997 kontrolliti immuunoblotiga (Joonis 6). Koos histooniga H3 ekspresseeruva E4 epitoobi tunneb ära antikeha 1E2 ning Rpb3-ga koos ekspresseeruva E2 epitoobi tunneb ära antikeha 5E11.



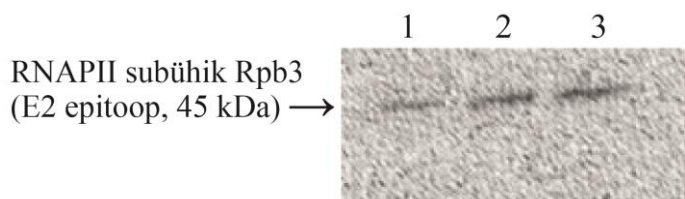
Joonis 6. Epitoopmärgistega H3 ja RNAPII detekteerimine immuunoblotil (A) Kolmekordse E4 epitoobi kontroll immuunoblotil. Esimesel rajal on marker, teisel rajal on negatiivne kontroll AKY212 (H3-*E2tag*), kolmandal rajal on uuritav tüvi AKY997 (H3-*3xE4tag*), neljandal rajal on positiivne kontroll AKY693 (C45-*E4tag*). Primaarse antikehana kasutati Mouse Anti-E4 antikeha 1E2 ning sekundaarse antikehana kasutati Goat Anti-Mouse antikeha, millele oli lisatud aluseline fosfataas. Radadele on kantud WCE. (B) Ühekordse E2 epitoobi kontroll immuunoblotil. Esimesel rajal on marker, teisel rajal on positiivne kontroll AKY212 (H3-*E2tag*), kolmandal rajal on negatiivne kontroll AKY693 (C45-*E4tag*), neljandal rajal on uuritav tüvi AKY997 (Rpb3-*E2tag*). Primaarse antikehana kasutati Mouse Anti-E2 antikeha 5E11 ning sekundaarse antikehana kasutati Goat Anti-Mouse antikeha, millele oli lisatud aluseline fosfataas. Signaal tehti nähtavaks aluselise fosfataasi abil kolomeetrilisel meetodil. Radadele on kantud WCE.

Joonisel 6 on näha, et histooni H3 C-terminuses asuva E4 epitoobi signaal on tugev (joonis 6A). Negatiivne kontroll õnnestus, sest on näha, et tüve AKY212 histoon H3 küljes oleva E2 epitoobiga antikeha 1E2 ei seondunud. Antikeha 1E2 ei seondunud ka positiivse kontrolli AKY693 C45 küljes oleva E4 epitoobiga, ehkki selle oleks pidanud antikeha 1E2 ära tundma. Põhjus, miks antikeha 1E2 positiivse E4 epitoopi ära ei tundnud, oli ilmselt tüves AKY693. Võimalik, et tüves AKY693 oli valku C45 väga vähe. Teine põhjus võib olla selles, et tüves AKY693 oli vähe või puudusid täielikult E4 epitoobid.

RNAPII Rpb3 C-terminuses asuva E2 signaal on väga nõrk (joonis 6B). Põhjuseks võib olla E2 epitoobi vähene korduste arv. Seetõttu otsustati E2 epitoobi korduste arvu RNAPII subühikul Rpb3 suurendada kaks ja kolm korda. Negatiivne ja positiivne kontroll tulid välja, sest on näha, et positiivse kontrolli puhul on antikeha 5E11 E2 epitoobi ära tundnud. Negatiivse kontrolli puhul antikeha 5E11 E4 epitoobiga ei seondunud.

E2 epitoobi korduste arvu suurendamiseks moodustati järgnevalt ristamise teel veel kaks tüve: AKY1049 ja AKY1050. Tüvel AKY1049 on RNAPII Rpb3 küljes kahekordne E2 epitoop ning tüvel AKY1050 on RNAPII Rpb3 küljes kolmekordne E2 epitoop. Kuna histoon H3 küljes olev kolmekordne E4 epitoop andis tugeva signaali, siis E4 epitoopide korduseid ei varieeritud.

RNAPII subühiku Rpb3 ekspressiooni kontrolliti tüvedes AKY997, 1049 ja 1050 immuunoblotiga. Rpb3 küljes oleva ühe-, kahe- ja kolmekordse E2 epitoobi tunneb ära antikeha 5E11 (Joonis 7).



Joonis 7. RNAPII Rpb3-ga seotud ühe-, kahe- ja kolmekordse E2 epitoobi kontroll *Western blot-il*. Esimesel rajal on RNAPII Rpb3 C-terminus seotud ühekordse E2 epitoobiga. Teisel rajal on Rpb3 seotud kahekordse E2 epitoobiga ning kolmandal rajal on Rpb3 küljes kolmekordne E2 epitoop. Primaarse antikehana kasutati antikeha 5E11, mis tunneb ära Rpb3 küljes olevad ühe-, kahe- ja kolmekordsed E2 epitoobid. Sekundaarse antikehana kasutati HRP-ga konjugeeritud hiire antikehade vastast antikeha. Signaal tehti nähtavaks kemoluminestsentse meetodi abil masinaga *Biospectrum*® *Imaging System*TM (*Ultra-Violet Products Ltd.*). Radadele on kantud WCE.

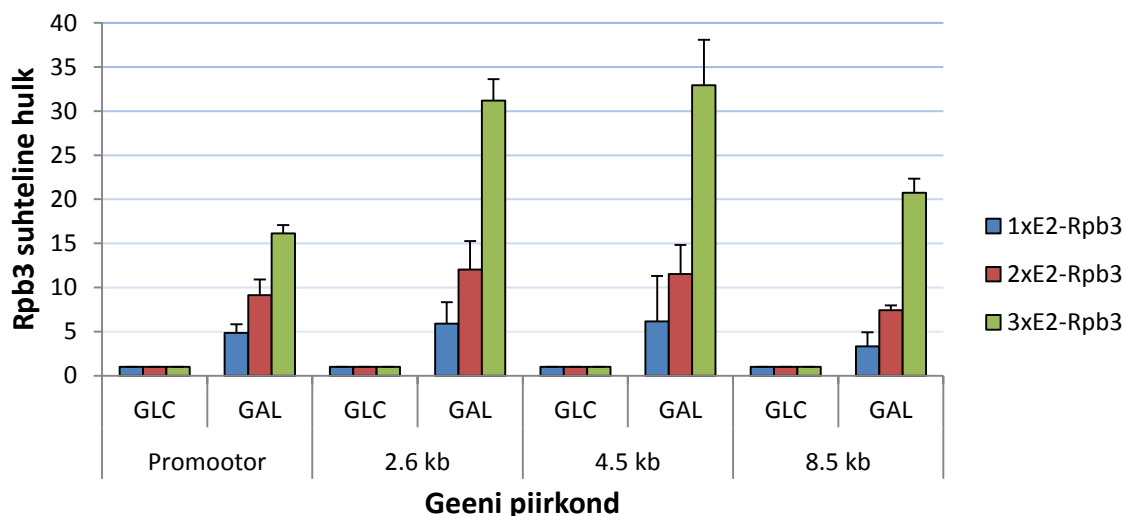
Rpb3 signaal on kõige nõrgem ühekordse E2 epitoobi korral. Kahe- ja kolmekordse E2 epitoobi signaalid on tugevamad. Kui kahe- ja kolmekordse E2 epitoopide signaale omavahel võrrelda, siis signaalide tugevustes silmaga detekteeritavat erinevust ei ole (joonis 7).

2.3.3 E2 epitoobi korduste arvu olulisus RNAPII detekteerimisel geeni aktiivsel transkribeerimisel

Järgnevalt vaadati, kuidas muutub epitoobi E2 detekteerimise tundlikkus, kui ta on Rpb3 subühikule seondunud ühe-, kahe- või kolmekordselt. Lisaks vaadati, kuidas muutub RNAPII hulk *GAL-VPS13* geenil, kui transkriptsioon on aktiveeritud. Rakke AKY997 (H3-3x*E4tag*, Rpb3-1x*E2tag*), AKY1049 (H3-3x*E4tag*, Rpb3-2x*E2tag*) ja AKY1050 (H3-3x*E4tag*, Rpb3-3x*E2tag*) kasvatati üleöö galaktoosis ja glükoosis. Galaktoosis kasvanud rakkudes aktiveeriti transkriptsioon ning glükoosis kasvanud rakud olid indutseerumata olekus, mistõttu *GAL-VPS13* geeni transkriptsioon oli inhibeeritud. Üleöö galaktoosis ja glükoosis kasvanud rakkudest valmistati WCE ja teostati kromatiini immuunosadestamine, kasutades 5E11 ja 1E2 antikehi. Saadud DNA fragmente analüüsiti qPCRil *GAL-VPS13* spetsiifiliste praimeritega. Kõik tulemused normaliseeriti *FBA1*-ga, mis on konstitutiivselt ekspresseeritav geen. *FBA1* asub pagaripärmi IX kromosoomis ja ta on vajalik glükolüüsis ja glükoneogeneesis. *FBA1* ei ole reguleeritav katsetes kasutatava glükoos-galaktoos aktivatsiooni ja repressiooni süsteemiga. Et epitoopide suhted oleksid omavahel paremini võrreldavad, on tulemused normaliseeritud ka glükoosi suhtes, kus *GAL-VPS13* geenil transkriptsiooni ei toimu ja RNAPII ei esine. Seetõttu RNAPII hulka transkriptsiooni inhibitsioonil ei vaadata.

Immuunosadestamine kinnitas, et Rpb3 suhteline hulk geenil kasvab, kui epitoobi kordused kasvavad (joonis 8).

RNA polümeraas II märgistatud 1-, 2- ja 3-kordse E2 epitoobiga



Joonis 8. RNAPII subühiku Rpb3 hulga, kui need on märgistatud 1-, 2- ja 3-kordse E2 epitoobiga.

Sinise värviga on kujutatud tüvi AKY997, kus Rpb3 on märgistatud ühekordse E2 epitoobiga. Punase värviga kujutatakse tüve AKY1049, kus on Rpb3 märgistatud kahekordse E2 epitoobiga. Rohelise värviga on märgitud tüvi AKY1050, kus Rpb3 küljes on kolmekordne E2 epitoop. Tüved kasvatati üleöö galaktoosis ja glükoosis. Glükoosi sisaldavas söötmes transkriptsiooni *GAL-VPS13* geenilt ei toimu, galaktoosi sisaldavas söötmes esineb aktiivne transkriptsioon. Kõigi kogutud proovidega tehti kromatiini immuunosadestamine (ChIP) 5E11 antikehaga, mis tundis ära E2 epitoobi. Kõik tulemused analüüsiti qPCR-il *GAL-VPS13* spetsiifiliste praimeritega (promootorala, 2.6 kb, 4.5 kb, 8.5 kb) ja normaliseeriti *FBA1* ja glükoosi suhtes. Joonisel on näha kolme katse kordused ja veapiiride puhul on kasutatud standardviga.

See tähendab, et ei saa teha üheselt mõistetavat järeldust, kui suur on pärimüves Rpb3 suhteline hulk, vaid see sõltub Rpb3-ga seondunud epitoopide arvust. Ühe- ja kahekordse epitoobiga märgitud Rpb3 subühikute hulga vahe on 2-kordne. Kahe- ja kolmekordse epitoobiga märgitud Rpb3 subühikute hulga vahe on ligi 3-kordne. Kui võrrelda ühekordselt märgitud Rpb3 subühikute hulga kolmekordselt märgitud Rpb3 subühikute hulgaga, siis on vahe 5-kordne.

Sõltumata E2 epitoobi kordsusest jaotub RNAPII mudelgeenil sarnaselt. Galaktoosis on transkriptsioon aktiveeritud, mistõttu on polümeraasi palju (joonis 8). Kõige tugevam signaal on polümeraasi *GAL-VPS13* geeni keskosas, kuid selle hulk väheneb geeni 3' otsa suunas. See tähelepanek on kooskõlas varasemate uuringutega, kus uuriti samuti rakupopulatsiooni ning leiti, et *GAL-VPS13* geenil väheneb polümeraasi hulk 3'otsa suunas (Peil, *et al.* 2011).

Samas on ühe raku tasemel RNAPII molekulid jaotunud ühtlaselt. Seega on populatsioonisisese RNAPII ebaühtluse põhjuseks see, et paljudes rakkudes transkriptsiooni küll alustatakse, ent see katkeb (Peil, *et al.* 2011).

Siinsete tulemuste põhjal on RNAPII molekule transkribeeritava geeni promootoralal vähem kui geeni kodeerival alal (Joonis 8). See tulemus on vastuolus varem avaldatuga (Peil, *et al.* 2011), kus promootoralal geeni 5' otsas oli tugevam polümeraasi signaal, võrreldes geeni kodeeriva alaga. Erinevus võib tuleneda sellest, et eelnimetatud uuringus on katse tehtud 30 minutit pärast transkriptsiooni aktiveerimist galaktoosiga. Seetõttu ei ole transkriptsioon väga kaua kestnud ning geeni 5' otsas võib olla rohkem RNAPII molekule. Käesoleva töö käigus kasvatati rakke üleöö indutseerivates tingimustes, mistõttu on geeni keskel rohkem polümeraasi, sest transkriptsioon on juba mõnda aega kestnud.

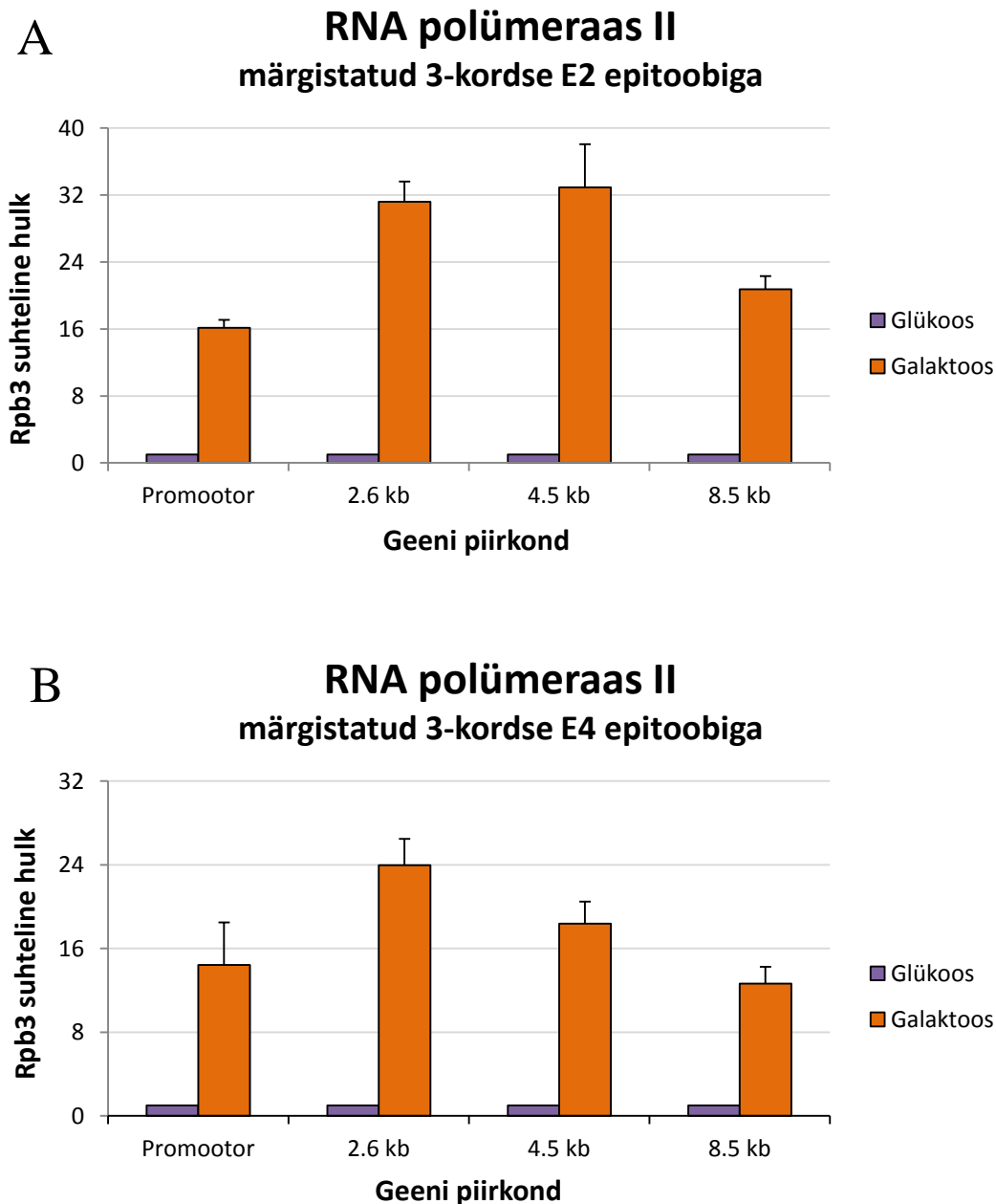
2.3.4 E2 ja E4 epitoopide võrdlemine RNAPII detekteerimisel *GAL-VPS13* geeni aktiivsel transkribeerimisel

Järgnevalt võrreldi E2 ja E4 epitoopide efektiivsust. Selleks vaadati, kui palju on subühikut Rpb3, kui sellega on seondunud kolmekordne E2 epitoop ning võrreldi olukorraga, kus RNAPII subühikuga Rpb3 on seotud kolmekordne E4 epitoop. Seda tehti, kasutades kromatiini immuunosadestamise meetodit. Tulemused on normaliseeritud *FBA1* ja glükoosi suhtes.

Lisaks uuriti, kui palju on geenil *GAL-VPS13* RNAPII, kui transkriptsioon on aktiveeritud

Polümeraasi märkimisel kolmekordsete E2 ja E4 epitoopidega selgus, et vahe signaali detekteerimises on olemas: E2 epitoobi kasutamisel on signaal suurem, võrreldes E4 epitoobi kasutamisega. Edaspidi võiks uurida, kas samasugune efektiivsuse erinevus kehtib ka vastavalt ühe- ja kahekordsete epitoopide puhul.

Ka siinsete tulemuste korral jaotub RNAPII mudelgeenil sarnaselt, sõltumata erinevatest epitoopidest (joonis 9). Galaktoosis kasvanud rakkudes on polümeraasi mudelgeenil palju ning sarnaselt eelmisele joonisele (joonis 8) on näha, et polümeraasi hulk väheneb mudelgeeni 3'otsa suunas ning polümeraasi on transkriptsiooni korral promootoralal vähem kui *GAL-VPS13* geeni kodeerival alal.



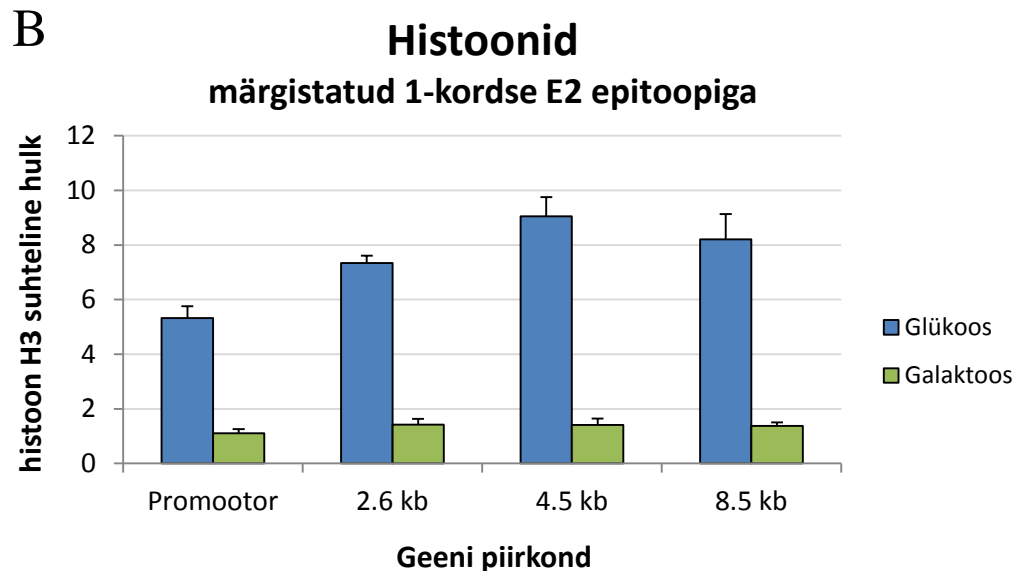
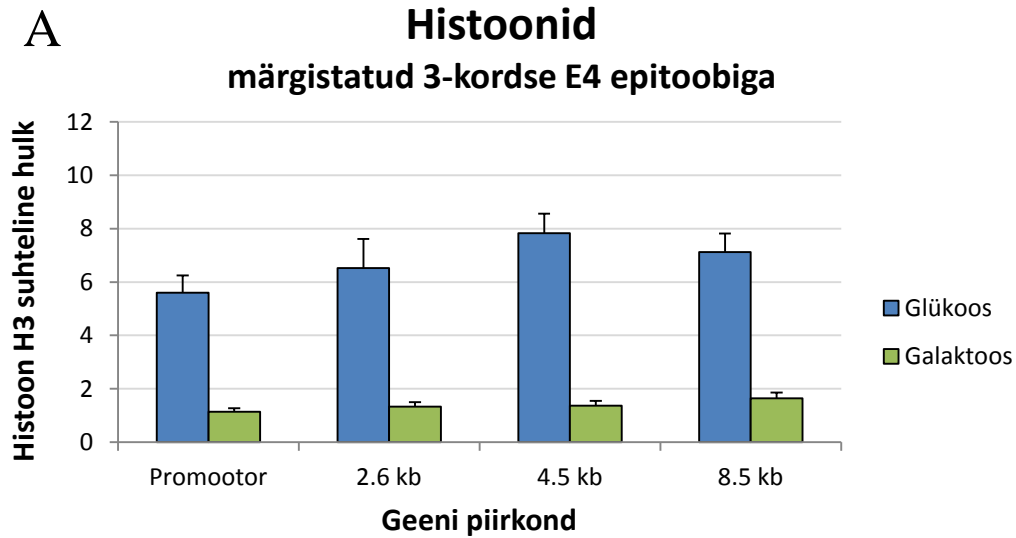
Joonis 9. RNAPII suhteline hulk mudelgeenil *GAL-VPS13*. (A) RNAPII subühik Rpb3 on märgistatud kolmekordse E2 epitoobiga. Kõigi kogutud proovidega tehti kromatiini immuunosadestamine (ChIP) 5E11 antikehaga, mis tundis ära E2 epitoobi. (B) RNAPII subühik Rpb3 on märgistatud kolmekordse E4 epitoobiga. Kõigi kogutud proovidega tehti kromatiini immuunosadestamine (ChIP) 1E2 antikehaga, mis tundis ära E4 epitoobi. Tüvesid kasvatati üleöö galaktoosis ja glükoosis. Glükoosis transkriptsiooni *GAL-VPS13* geenilt ei toimu, galaktoosis esineb aktiivne transkriptsioon. Kõik tulemused analüüsiti qPCR-il *GAL-VPS13* spetsiifiliste praimeritega (promootorala, 2.6 kb, 4.5 kb, 8.5 kb) ja normaliseeriti *FBA1* ja glükoosi suhtes. Joonisel on näha kolme katse kordused ja veapiiride puhul on kasutatud standarddviiga.

2.3.5 E2 ja E4 epitoopide võrdlemine histoon H3 detekteerimisel *GAL-VPS13* geeni transkribeerimisel ja inhibeerimisel

Järgnevalt uuriti, kas E2 ja E4 epitoobid on histoon H3 märgistamisel sama efektiivsed ning kuidas muutub nukleosoomide hulk mudelgeeni transkriptsioonil ning inhibeerimisel.

Selleks vaadati, kui palju on histooni H3, kui sellega on seondunud ühekordne E2 epitoop ning võrreldi olukorraga, kus histoon H3-ga on seotud kolmekordne E4 epitoop. Seda tehti, kasutades kromatiini immuunosadestamise meetodit.

Rakke AKY362 (H3-1xE2tag, Rpb3-3xE4tag) ja AKY1050 (H3-3xE4tag, Rpb3-3xE2tag) kasvatati üleöö galaktoosis ja glükoosis. Galaktoosis kasvanud rakkudes aktiveeriti transkriptsioon ning glükoosis kasvanud rakud olid indutseerumata olekus, mistõttu *GAL-VPS13* geeni transkriptsioon oli inhibeeritud. Üleöö galaktoosis ja glükoosis kasvanud rakkudest valmistati WCE ja teostati kromatiini immuunosadestamine, kasutades 5E11 ja 1E2 antikehi. Saadud DNA fragmente analüüsiti qPCRil *GAL-VPS13* spetsiifiliste praimeritega. Kõik tulemused normaliseeriti *FBA1*-ga.



Joonis 10. Histoon H3 suhteline hulk mudelgeenil *GAL-VPS13*. (A) Histoon H3 märgistati kolmekordse E4 epitoobiga. Kõigi kogutud proovidega tehti kromatiini immuunosadestamine (ChIP) 1E2 antikehaga, mis tundis ära E4 epitoobi. (B) Histoon H3 märgistati ühekordse E2 epitoobiga. Kõigi kogutud proovidega tehti kromatiini immuunosadestamine (ChIP) 5E11 antikehaga, mis tundis ära E2 epitoobi. Tüved kasvatati üleöö galaktoosis ja glükoosis. Glükoosi sisaldavas söötmes transkriptsiooni *GAL-VPS13* geenilt ei toimu, galaktoosi sisaldavas söötmes esineb aktiivne transkriptsioon. Kõik tulemused analüüsiti qPCR-il *GAL-VPS13* spetsiifiliste praimeritega (promootorala, 2.6 kb, 4.5 kb, 8.5 kb) ja normaliseeriti *FBAl*-ga. Joonistel on näha kolme katse kordused ja veapiiride puhul on kasutatud standardviga.

Selgus, et histoonide märkimisel E2 ja E4 epitoobiga ei ole vahet, millist epitoopi või kordsust kasutada. Epitoobid töötavad võrdselt hästi. Võib järeldada, et E2 epitoop on efektiivsem, sest seda peab olema ainult üks kordus, et saavutada samaväärne tulemus E4 epitoobiga, mida on kolm kordust.

Põhjus, miks histoonide puhul ei ole vahet, millist ja millise kordsusega epitoopi kasutada, võib olla selles, et histooni H3 puhul tegemist on valguga, mida on koguseliselt palju ning mis paikneb DNA-l kindlas kohas. Sel juhul pole vahet, kui palju epitoope valgule lisada, sest ChIP abil on DNA-d võimalik hästi detekteerida, olenemata sellest, millises korduses epitoobid valkude küljes on. Kui tegu on valguga, mis viibib DNA konkreetsetes positsioonides lühiajaliselt (näiteks RNAPII), siis on DNA detekteeritavuse parandamiseks vaja lisada rohkem epitoope.

Edaspidi peaks võrreldavuse parandamiseks kõrvutama tüve, kus histoon H3 C-terminuses on ühekordne E4 epitoop, tüvega, kus histoon H3 C-terminuses on ühekordne E2 epitoop.

Samuti võiks võrrelda E2 ja E4 epitoopide efektiivsust ka teiste – maailmas laiemalt levinud epitoopidega – myc, FLAG ja HA epitoopide efektiivsusega.

Sõltumata valitud epitoobist, muutub histoonide hulk mudelgeeni transkribeerimisel ja inhibeerimisel sarnaselt.

GAL-VPS13 geeni transkriptsioonil eemaldatakse promootoritelt rohkem nukleosoomi kui kodeerivatelt aladelt. Seda võib seletada varasemalt pagaripärmiga teostatud ülegenoomse uuringuga, mille tulemusena leiti, et aktiivselt transkribeeritavate geenide promootoritelt eemaldatakse rohkem nukleosoomi kui geeni kodeerivalt alalt. Selleks kasutati katsetes FLAG epitoobiga histooni H2B ning histooni H3 jaoks H3-spetsiifilist antikeha. Katse viidi läbi DNA mikrokiip-tehnoloogiat kasutades (Bernstein, *et al.* 2004).

Bernsteini katsele toetudes võiks järeldada, et kuna *GAL-VPS13* geen on kõrgelt transkribeeritav, siis on loogiline, et mudelgeeni aktivatsioonis on promootoril vähem nukleosoomi kui geeni kodeerival alal (joonis 10). Lisaks eemaldatakse nukleosoomid ka geeni kodeerivalt alalt. See tulemus kinnitab varasemaid katseid, kus *GAL-VPS13* geenilt eemaldatakse transkriptsiooni aktiveerimisel nukleosoomid kogu geeni ulatuses (Kristjuhan ja Svejstrup, 2004).

GAL-VPS13 geeni repressioonil on promootoril vähem nukleosoomi kui geeni kodeerival alal (joonis 10). See on kooskõlas varasemate uuringutega, kus näidati, et konstitutiivselt ekspresseeritavatel geenidel on promootori piirkonnas ~150 bp pikkune nukleosoomivaene piirkond (Cairns, 2009).

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös arutleti, kuidas muutub nukleosoomide suhteline hulk mudelgeenil *GAL-VPS13* geeni transkribeerimisel ning inhibeerimisel. RNAPII hulga muutust vaadati ainult transkribeeritaval geenil *GAL-VPS13*.

- Transkribeeritaval mudelgeenil on polümeraasi palju, kuid see on jaotunud ebaühtlaselt: promootoralal on polümeraasi vähem kui geeni kodeerival alal ning RNAPII hulk väheneb uuesti *GAL-VPS13* geeni 3' otsa suunas.
- Transkribeeritaval mudelgeenil eemaldatakse nukleosoomid kogu geeni ulatuses, kuid promootoralal on neid veelgi vähem.
- Inaktiveeritud mudelgeenis on nukleosoomide promootoralal vähem kui geeni kodeerivas piirkonnas.

Nukleosoomide ja RNAPII hulga määramiseks märgiti histoon H3 ja Rpb3 erinevate epitoopidega. Töö käigus võrreldi epitoopide E2 ja E4 efektiivsust RNAPII ja histoonide märkimisel.

- RNAPII subühikut Rpb3 tuleks märkida E2 epitoobiga, sest see on E4 epitoobist efektiivsem.
- Leiti, et histoon H3 märkimisel võiks kasutada pigem E2 epitoopi, sest histooni H3 märkimine ühekordse E2 epitoobiga andis sarnase tulemuse kui histoon H3 märkimine kolmekordse E4 epitoobiga.
- E2 epitoopide korduste suurenemine suurendab Rpb3 märkimise efektiivsust. Ühe- ja kolmekordse E2 epitoobi efektiivsuse erinevus on 5- kordne. Histooni H3 märkimise efektiivsust erinevate kordsustega epitoobid ei suurendanud.

The Amount of RNAPII and Nucleosomes on the Transcribing Gene in Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*

Merilin Väärtnõu

SUMMARY

DNA consists of nucleosomes, which has two copies of H2A, H2B, H3 and H4 canonical histones, around which 147 bp of DNA is wound. Packaging the DNA into chromatin makes it more compact, but it also hinders many DNA-related processes, for example transcription. During transcriptional activation, nucleosomes are evicted and there are many RNAPII molecules on the transcribing gene. In inactive genes there are less RNAPII molecules and more DNA-bound nucleosomes.

In this study, we used budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* to examine how the amounts of nucleosomes change during inhibition and activation of the galactose-activated model gene *GAL10-VPS13*. The amounts of RNAPII were examined only on the transcribing model gene.

During the inhibition of the *GAL-VPS13* gene, there were more nucleosomes in the coding area of the gene than in the promoter region.

During the activation of the *GAL-VPS13* gene, there were many RNAPII complexes which accumulated unevenly on the gene: They were less densely located in the promoter region and at the end of the gene and more in coding region. As for the nucleosomes, almost all of them were evicted from the entire gene and it was seen that in the promoter region, there were even less nucleosomes.

We also tagged RNAPII and histone H3 with different epitopes: E2 and E4 and compared the change in the amounts of RNAPII and nucleosomes. Results showed that we should prefer E2 epitopes while tagging RNAPII and histone H3 because the detection was better. We also saw that when we increased the amount of epitopes, the detection of RNAPII was remarkably better. We didn't see the same correlation regarding histone H3: the detection was good regardless of how many epitopes were used.

KIRJANDUSE LOETELU

Adkins, M.W. *et al.* (2004) Chromatin disassembly mediated by the histone chaperone Asf1 is essential for transcriptional activation of the yeast PHO5 and PHO8 genes. *Mol Cell*, **14**, 657-666.

Alberts, B. *et al.* (2001) Molecular Biology of the Cell. *Garland Science*

Altaf, M. *et al.* (2007) NuA4-dependent acetylation of nucleosomal histones H4 and H2A directly stimulates incorporation of H2A.Z by the SWR1 complex, *J. Biol. Chem.*, **285**, 15966-15977.

Belotserkovskaya, R. *et al.* (2003) FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration, *Science*, **301**, 1090-1093.

Bernstein B-E. *et al.* (2004) Global nucleosome occupancy in yeast, *Genome Biol*, **5**: R62.

Bi, X. (2014) Heterochromatin structure: lessons from the budding yeast, *IUBMB Life*, **66**, 657-666.

Bushnell D.A., Kornberg, R.D. (2003) Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-Å resolution: implications for the initiation of transcription, *PNAS*, **100**, 6969-6973.

Cairns, B.R. (2009) The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters, *Nature*, **461**, 193-198.

Cramer, P. *et al.* (2008) Structure of eukaryotic RNA polymerase, *Annual Review of Biophysics*, **37**, 337-352.

Cramer, P. (2004) RNA polymerase II structure: from core to functional complexes, *Current Opinion in Genetics and Development*, **14**, 218-226.

Cramer, P. *et al.* (2001) Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Å resolution. *Science*, **292**, 1863-1876.

Cutter, A.R., Hayes, J.J. (2015) A brief review of nucleosome structure, *FEBS Letters*.

Eriksson, P.R. *et al.* (2012) Regulation of histone gene expression in budding yeast, *Genetics*, **191**, 7-20.

Hahn, S. (2004) Structure and mechanism of the RNA Polymerase II transcription, *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 394-403.

- Kaldalu, N. *et al.* (2000) Monitoring and purification of proteins using bovine papillomavirus E2 epitope TAGs, *Biotechniques*, **28**, 456-460.
- Kimple, M. E., Brill, A. L.; Pasker, R. L. (2013) Overview of affinity TAGs for protein purification, *Curr Protoc Protein Sci*, **73**.
- Knippa, K., Peterson, DO. (2013) Fidelity of RNA polymerase II transcription: Role of Epb9 in error detection and proofreading, *Biochemistry*, **52**, 7807-7817.
- Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function, *Cell*, **128**, 693-705.
- Kristjuhan, A., Svejstrup, J.Q. (2004) Evidence for distinct mechanisms facilitating transcript elongation through chromatin *in vivo*. *EMBO Journal*, **23**, 4243-4252.
- Kulaeva, O.I., Hsieh, F-K., Studitsky, V.M. (2010) RNA polymerase complexes cooperate to relieve the nucleosomal barrier and evict histones, *PNAS Early Edition*, **107**, 11325-11330.
- Li, B. *et al.* (2007) The role of chromatin during transcription, *Cell*, **128**, 707-719.
- Luger, K. *et al.* (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251-260.
- Luger, K., Hansen, J.C. (2005) Nucleosome and chromatin fiber dynamics, *Current Opinion in Structural Biology*, **15**, 188-196.
- Lõoke, M. *et al.* (2011) Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications, *Biotechniques*, **50**, 325-328.
- Mariño-Ramírez, L. *et al.* (2005) Histone structure and nucleosome stability, *Expert Rev Proteomics*, **5**, 719-729.
- Meluh, P.B. *et al.* (1998) Cse4p is a component of the core centromere in *Saccharomyces cerevisiae*, *Cell*, **94**, 607-613.
- Olins, D.E., Olins, A.L. (2003) Chromatin history: our view from the bridge. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 809-814.
- Park, J-S., Neiman, A. M. (2012) VPS13 regulates membrane morphogenesis during sporulation in *saccharomyces cerevisiae*, *J Cell Science*, **125**, 3004-3011
- Peil, K. *et al.* (2011) Uniform distribution of elongating RNA polymerase II complexes in transcribed gene locus. *JBC*, **286**, 23817-23822.

- Rando, O.J., Winston, F. (2012) Chromatin and transcription in yeast, *Genetics*, **190**, 351-387.
- Rodriguez-Gil, A. *et al.* (2010) The distribution of active RNA polymerase II along the transcribed region is gene-specific and controlled by elongation factors, *Nucleic Acid Research*, **2010**, 4651-4664.
- Sabourin, M. *et al.* (2007) A flexible protein linker improves the function of epitope-TAGged proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **24**, 39-45.
- Santisteban, M.S. *et al.* (2011) Histone variant H2A.Z and RNA polymerase II transcription elongation, *Molecular and Cellular Biology*, **10**, 1848-1860.
- Saunders, A. *et al.* (2006) Breaking barriers to transcription elongation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 557-567.
- Schwabish, M.A., Struhl, K. (2004) Evidence for eviction and rapid deposition of histones upon transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, **24**, 10111-10117.
- Selth L.A., Sigurdsson, S., Svejstrup, J.Q. (2010) Transcript elongation by RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem*, **79**, 271-293.
- Shilatifard, A. (1998) Factors regulating the transcriptional elongation activity of RNA polymerase II, *Faseb J*, **12**, 1437-1446.
- Shilatifard, A. (2004) Transcriptional elongation control by RNA polymerase II: a new frontier. *Biochim Biophys Acta*, **1677**, 79-86.
- Smith M.M., Murray K. (1983) Yeast H3 and H4 histone messenger rRNAs are transcribed from two non-allelic gene sets, *J. Mol. Biol.*, **169**, 641-661
- Struhl, K. (2007) Transcriptional noise and the fidelity of initiation by RNA polymerase II, *Nature Structural and Molecular Biology*, **14**, 103-105.
- Svejstrup, J.Q. (2004) The RNA polymerase II transcription cycle: cycling through chromatin, *Biochim Biophys Acta*, **1677**, 64-73.
- Tamm, T. (2009) Plasmids with E2 epitope-TAGs: TAGging modules for N- and C-terminal PCR-based gene targeting in both budding and fission yeast, and inducible expression vectors for fission yeast, *Yeast*, **26**, 55-66.

Värv, S., K.Kristjuhan, *et al.* (2007) RNA polymerase determines the area of nucleosome loss in transcribed gene loci, *Biochem Biophys Res Commun*, **358**, 666-671.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://icosagen.com/products/antibodies/12229>

LISA 1

Kromatiini immunosadestamise puhvrid:

PBS (10x, pH 7.4) 1000 ml

2 g KCl

80 g NaCl

17.8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

2.4 g KH_2PO_4

FA-lüüsipuhver 50 mM

Hepes-KOH pH 7.5

140 mM NaCl

1 mM EDTA

1% Triton X-100

0.1% Na deoksühoolhape

FA500 50 mM

Hepes-KOH pH 7.5

500 mM NaCl

1 mM EDTA

1% Triton X-100

0.1% Na deoksühoolhape

TES 10 mM Tris-HCl pH 7.5

1 mM EDTA

100 mM NaCl

Elueerimispuhver 100 mM

Tris pH 7.8

10 mM EDTA

1% SDS

400 mM NaCl

Western-blot-il kasutatud puhvrid:

TBS (1x, pH 7.5)

50 mM Tris-Cl, pH 7.5

150 mM NaCl

TBS-0.01% Tween20 (pH 7.6)

50 mM Tris-Cl

150 mM NaCl

0.01% Tween 20

PBS (1x, pH 7.4)

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

1.8 mM KH₂PO₄

PBS-0.01% Tween20 (pH 7.4)

137 mM NaCl

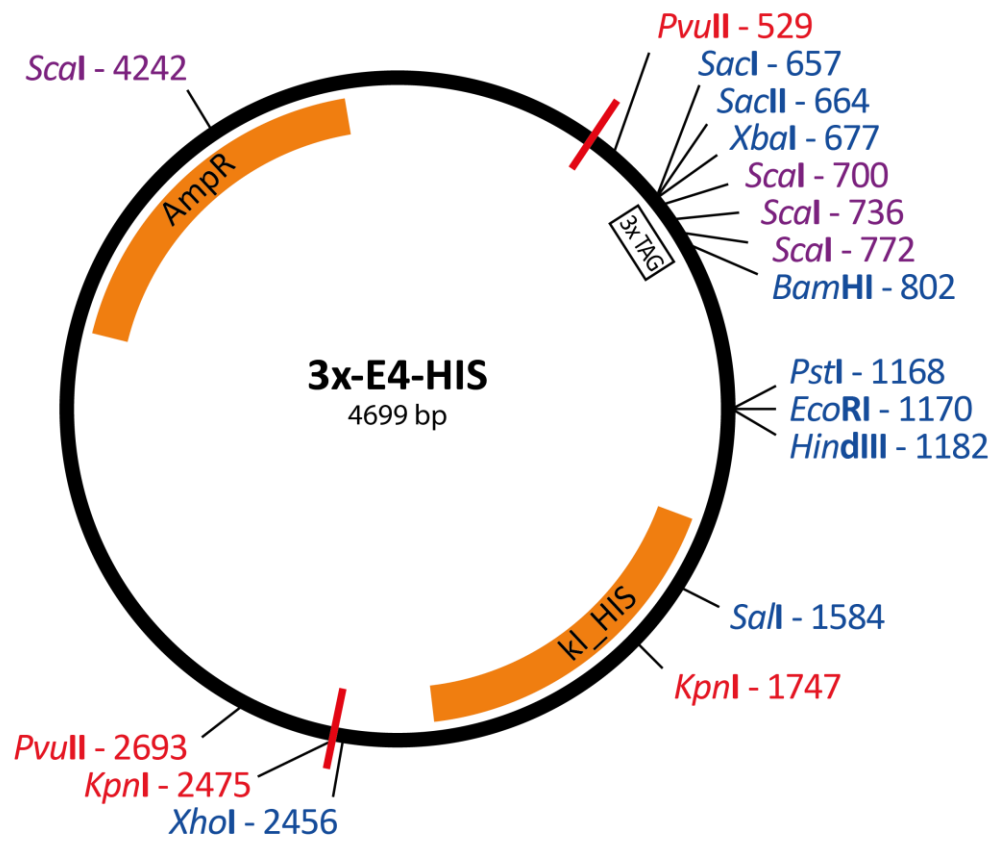
2.7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

1.8 mM KH₂PO₄

0.01% Tween20

LISA 2



TÄNUSÕNAD

Sooviksin tänada oma juhendajaid: Signe Värvi, kes tutvustas mulle uurimisteemat ning õpetas mulle selgeks põhitehnikad; Henel Seina, kes on minuga kaasas käinud terve teekonna, olles abiks nõu ja jõuga nii päeval kui öösel; Arnold Kristjuhanit, kes oskas vastata kõikidele küsimustele, mis selle tööga seoses tekkisid. Tänan teid igakülgse toetuse ja kannatlikkuse eest. Tänan ka kromatiini uurimisgrupi liikmeid, kes on mind nende aastate jooksul palju aidanud ja õpetanud.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Merilin Väärtnõu,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
„RNAPII ja nukleosoomide hulga määramine transkribeeritaval geenil“,
mille juhendajad on Arnold Kristjuhan (PhD), Henel Sein (MSc) ja Signe Värv (PhD)
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **24.05.2016**